



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**ANETOL'ÜN DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN HASARINDA DOZ
BAĞIMLI KORUYUCU ETKİSİNİN APOPİTOTİK VE İNFLAMATUAR
PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE OKSİDATİF STRES YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Dr. AZİZ ÇEVİK
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR-2023



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**ANETOL'ÜN DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN HASARINDA DOZ
BAĞIMLI KORUYUCU ETKİSİNİN APOPİTOTİK VE İNFLAMATUAR
PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE OKSİDATİF STRES YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Dr. AZİZ ÇEVİK
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. TEVFİK YILMAZ

DİYARBAKIR-2023

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübelerini bizden esirgemeyen aynı zamanda tez çalışmamın planlanması, hazırlanması ve yapılmasında bana yol gösterici olan; deneyimlerinden faydalandığım, kıymetli tez danışmanım sayın Prof.Dr. Tevfik YILMAZ'a şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Beraber çalışma fırsatı yakaladığım, eğitim sürecimde bilgi, hoşgörü ve sabrını benden esirgemeyen hocalarım Prof.Dr.Adnan Ceviz'e, Dr.Öğretim Üyesi İbrahim Başar abime ve Dr.Öğretim Üyesi Abdurrahim Taş abime, Doç.Dr.Yahya TURAN'a, Doç.Dr. Hüseyin ÖZEVREN'e;

Siverek'te beraber bu yola başladığım beraber aynı klinikte çalışmaya devam ettiğim hoşgörüsü ve bilgisiyle tez çalışmamda yardımlarını benden esirgemeyen canım abim şefim Op.Dr.Burak ATLAS'a;

Birlikte çalışmaktan ve aynı ekipte olmaktan onur duyduğum ve çok şey öğrendiğim şeflerim Op.Dr.Kamuran AYDIN, Op.Dr.Bariş ASLANOĞLU, Op.Dr.Sezer Onur GÜNARA, Op.Dr.Rıdvan ÇETİN'e ve kıdemdaşım Dr.Mehmet Salih ATAMA'ya , deneyimin histopatolojik incelemesini yapan Dr.Öğr.Üyesi Uğur ŞEKER'e ve aynı ekibin bir parçası olduğum Dr.Abdullah YİĞİT, Dr.Bariş ALTUN, Dr.Abdulkadir KANKILIÇ, Dr.Muhammed Mazlum KILIÇ, Dr. İsmail Behçet BAZ, Dr.Ahmet CEBE, Dr.Mehmet Akif ÇELİK, Dr.Volkan MİROĞLU, Dr.Tacettin KAYA, Dr.Burcu BİLİCİ, Dr.Ali Fırat YEL ile beraber bütün hemşire ve personellere;

Bu günlere gelmemi sağlayan ve her daim yanımda olan başta değerli anneme, babama, kardeşlerime ve can dostum Öner BORA'ya;

Zorlu asistanlık sürecinde çoğu zaman yanlarında olamadığım, bu huysuz zamanlarımda bana katlanan, her fısatta yanımda olan, sevgili eşim hayat arkadaşım Nefel ÇEVİK'e ve canım oğlum Ömer Ali'ye teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Aziz ÇEVİK
Diyarbakır, 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1- Travmatik Beyin Yaralanmaları	3
2.1.1- Travmatik Beyin Yaralanmalarında Tanımlama ve Tarihçe	3
2.1.2- Travmatik Beyin Yaralanmalarında Epidemiyoloji.....	3
2.1.3- Travmatik Beyin Yaralanmalarında Sınıflandırma.....	4
2.1.3.1. Primer Beyin Hasarlanmaları.....	6
Primer Beyin Hasarlanmalarının Morfolojik Sınıflaması	7
A-Cilt Yaralanmaları	7
B-Kafatası Kırıkları	7
1- Lineer Fraktür:	7
2- Çökme Fraktörü:	7
3- Kafa Kaide Fraktörü:	7
C-Bölgesel Beyin Yaralanmaları	7
1- Kontüzyon/İntraserebral Kanama:	7
2- Epidural Kanamalar:	8
3- Subdural Kanamalar:	8
D-Yaygın Beyin Yaralanmaları	8
1- Konküzyon:	8
2- Diffuz aksonal Hasarlanmalar:.....	8
E-Herniasyon ve Beyin Ödemi	9
1- Herniasyon:	9
2- Beyin ödemi:	9
a- Vazojenik ödem:	9
b- Sitotoksik ödem:	10
c- Hidrostatik ödem:.....	10
d- Hipoozmotik ödem:	10

e- İnterstisyel ödem :	10
f- Beyin şişmesi :	10
2.1.4- Travmatik Beyin Hasarı Belirteçleri.....	10
2.1.5- Travmatik Beyin Hasarında Patofizyolojik Süreçler	11
2.1.5.1. Oksidatif Hücre Hasarı Mekanizmaları	12
2.1.5.2.Eksitoksisite hücre hasarı mekanizmaları	13
2.1.5.3.Nöroinflamatuvar Hasar Mekanizması	13
2.1.5.4.Hücre Ölüm Mekanizması	14
2.1.6-Travmatik Beyin Yaralanmalarında Deney Hayvanları Modelleri.....	15
Direkt Travmatik Beyin Hasarı Modeli	16
Serbest Ağırlık Düşürme Modeli	16
Tekrarlayıcı Hasar Modeli	17
Sıvı Perküsyon Hasar Oluşturma Modeli.....	17
Kontrollü Kortikal Beyin Hasarı Modeli	17
Penetran-Balistik Hasar Modeli	18
2.1.7- Anetol'ün Kimyasal Yapısı ve Genel Özellikleri	18
1-Anetol'ün Kimyasal Özellikleri.....	18
2-Anetolün Farmakokinetiği	19
3-Anetolün Farmakolojik Etkinlikleri.....	20
3.1- Antioksidan Aktivite.....	20
3.2- Antimikrobiyal Aktivite	20
3.3- Spazmolitik Aktivite	20
3.4-Gastroprotektif Aktivite.....	21
3.5-Sekretolitik Aktivite	21
3.6-Antinosiseptif ve Anti-inflamatuar Aktivite	21
4-Anetolün Güvenliği ve Toksisitesi	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	24
1-Deney Gruplarının Belirlenmesi	24
2-Deneyin Yapılış Aşamaları.....	24
3-Alınan Dokuların Takip ve Boyama Aşamaları	27
3.1- Hematoksilen ve Eozin Boyama.....	28
3.2- İmmünohistokimyasal Boyama	28
3.3- İmmünohistokimyasal Kantitatif Değerlendirme	29
3.4- İstatistiksel Analiz	29
3.5- Malondialdehid(MDA) Tayini Analizi	30

3.6- İmmunohistokimya ve İstatistiksel Analiz	30
4.BULGULAR.....	31
Hematoksilen ve Eozin Bulguları	31
İmmunohistokimya Bulguları	34
Bax İmmunohistokimya Bulguları.....	34
Caspase 3 İmmunohistokimya Bulguları	37
TNF – α İmmunohistokimya Bulguları.....	39
MDA(Malondialdehid) Analiz Sonuçları	42
5.TARTIŞMA	43
6.SONUÇ	48
7.KAYNAKLAR	49



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: Glaskow Koma Skalası.....	4
Tablo 2: Deney grupları	24
Tablo 3: Grupların Doku MDA Düzeyleri.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Anetol'ün izomerleri.....	18
Şekil 2: Anetol'ün yapısı	18

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Travmatik beyin hasarı uygulanacak düzenek.....	25
Resim 2: Genel anestezi altındaki deney hayvanı.....	26
Resim 3: Travma oluşumu hemen sonrası	26
Resim 4: Travma uygulanmış hayvanın eksize beyin dokusu	27
Resim 5: Kontrol grubuna ait beyin kesitleri.....	31
Resim 6: Travma grubuna ait beyin kesitleri.	32
Resim 7: Travma + 40 mg/kg grubuna ait beyin kesitleri.....	32
Resim 8: Travma + 80 mg/kg grubuna ait beyin kesitleri.....	33
Resim 9: Travma + 160 mg/kg grubuna ait beyin kesitleri.....	34
Resim 10: Kontrol grubu Bax İmmunohistokimya.	34
Resim 11: Travma grubu Bax İmmunohistokimya.	35
Resim 12: Travma + 40 mg/kg grubu Bax İmmunohistokimya.	35
Resim 13: Travma + 80 mg/kg grubu Bax İmmunohistokimya.	36
Resim 14: Travma + 160 mg/kg grubu Bax İmmunohistokimya.	36
Resim 15: Kontrol grubu Caspase 3 İmmunohistokimya.	37
Resim 16: Travma grubu Caspase 3 İmmunohistokimya	37
Resim 17: Travma + 40 mg/kg grubu Caspase 3 İmmunohistokimya.....	38
Resim 18: Travma + 80 mg/kg grubu Caspase 3 İmmunohistokimya.....	38
Resim 19: Travma + 160 mg/kg grubu Caspase 3 İmmunohistokimya.....	39
Resim 20: Kontrol grubu TNF – α İmmunohistokimya.....	39
Resim 21: Travma grubu TNF – α İmmunohistokimya.....	40
Resim 22: Travma + 40 mg/kg grubu TNF – α İmmunohistokimya.	40
Resim 23: Travma + 80 mg/kg grubu TNF – α İmmunohistokimya.	41
Resim 24: Travma + 160 mg/kg grubu TNF – α İmmunohistokimya.	41

KISALTMALAR

AVM:Arteriovenöz Malformasyon

BOS:Beyin Omurilik Sıvısı

CTP: Cleaved Tau Protein

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

DAH:Diffuz Aksonal Hasar

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EMA: European Medicines Agency

JECFA:Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

GFAP:Glial Fibriler Asidik Protein

GKS:Glaskow Koma Skalası

GSH:Glutatyon

HSV-1: Herpes Simpleks Virüsü-1

HIV:Human Immunodeficiency Virus

IL-4: İnterlökin 4

IL-6: İnterlökin 6

IL-10: İnterlökin 10

IL-1 β : İnterlökin 1 beta

MBP:Myelin Bazik Protein

MDA: Malondialdehid

ML1a: Miyeloblastik Lösemi Hücreleri

KİBAS:Kafa İçi Basınç Artışı Sendromu

P53: Tümör Protein 53

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TBH:Travmatik Beyin Hasarı

TBY: Travmatik Beyin Yaralanması

TNF-alfa: Tümör Nekroz Faktör Alfa

ÖZET

ANETOL'ÜN DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN HASARINDA DOZ BAĞIMLI KORUYUCU ETKİSİNİN APOPİTOTİK VE İNFLAMATUAR PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE OKSİDATİF STRES YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

AMAÇ: Travmatik beyin hasarı (TBH), her yaşta görülebilen morbidite ve mortalitenin önemli sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir. Tüm dünyada her yıl 50 milyonu aşkın insan travmatik beyin hasarıyla karşılaşmaktadır. TBH'nın klinik özellikleri ve altında yatan kompleks patofizyoloji, özellikle klinik öncesi çalışmalarda, ayrıca faz I/II çalışmaların değerini daha da arttırmaktadır. Ancak halen travmatik beyin yaralanmalarının tedavisine yönelik cerrahi müdahale dışında terapötik bir yöntem halen geliştirilememiştir. Yapılmış olan araştırmalarda Anetol'ün antioksidan, antikanserojenik , anti-inflamatuar ve antihipernositif etkisinin olması bu bitkisel yağın son dönemlerde araştırmalarda önemli bir yer edinmesini sağlamıştır. Güçlü antioksidan potansiyeline yönelik bulgular Anetol'ün kalp iske mi reperfüzyon hasarında koruyucu olabileceğine yönelik veriler sunmuştur. Ucuz bir bitkisel bileşen olması ve kolay elde edilebilirliği sayesinde mevcut çalışmamızda Anetol'ün TBH modelinde koruyucu etkisini doz bağımlı şekilde araştırmayı planlamaktayız. Yaptığımız literatür taramasında antioksidan bir bileşen olduğuna yönelik veriler bulunan Anetol'ün TBH modeli oluşturulan hayvanlarda doz bağımlı koruyucu gücünün araştırılmasına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple söz konusu araştırma TBH araştırma başlığına yeni bir bakış açısı kazandıracak potansiyel taşımaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Bu çalışma için DÜSAM(Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama Araştırma Merkezi) biriminden 28-30gr ağırlığındaki yetişkin erkek farelerden 35 adet temin edildi. Bu 35 hayvan 5 gruba eşit sayıda olacak şekilde ayrıldı. Bu gruplar oluşturulduktan sonra kontrol grubundaki hayvanlara 72 saat boyunca herhangi bir uygulamada bulunulmadı. Travma grubundaki hayvanlara ağırlık düşürme yöntemi ile travma uygulandı ve daha sonra herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadan sadece analjezi uygulanarak optimal koşullarda takibi yapılarak deney sonunda sakrifikasyon sonrası dekapitasyon yapıldı. Travma sonrası doz bağımlı gruplarda ise öncelikle hayvanlara ksilazin ve ketamin yardımı ile genel anestezi uygulandı daha sonra serbest ağırlık düşürme yöntemi ile orta düzey travmatik beyin hasarı oluşturuldu ve travma uygulandıktan 3 saat sonra ve takip eden 72 saat boyunca aynı gün ve saatte bir grup için 40mg/kg anetol diğer grup için 80mg/kg anetol ve son

grup için ise 160mg/kg anetol oral gavaj olarak uygulandı. Tüm deney hayvanlarına son tedavi dozları uygulandıktan 1 saat sonra kalpten kan alınarak sakrifiye edildi. Toplanan beyin örnekleri %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonu içerisinde fikse edildi ve rutin histolojik takibe tabi tutuldu. Parafine gömülen dokulardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) ile rutin histopatolojik değerlendirme amacıyla boyandı. Ayrıca beyin dokularından alınan seri kesit örneklerine TNF-alfa, Bax, Kaspaz-3 immunohistokimya uygulanarak apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeyleri incelendi. Son olarak MDA düzeyleri bakılması için deneysel çalışmada biyopsi örneği alındı.

BULGULAR: Kontrol grubunda beyin dokusunun normal morfolojide olduğu meninge ile örtülü olduğu ve bol miktarda nöron ve glial hücre barındırdığını fakat travma grubunda yoğun hemoraji, vasküler konjesyon görüldü. Nöron hücre gövdelerinde piknotik çekirdek görüntüsü, karyolizis ve yer yer perinöral kavitede artış ve ödem alanları izlendi. Travma sonrası 80mg/kg ve üzeri anetol uygulaması sonrası piknozis olduğu fakat piramidal nöronların piramit üçgen görüntüsünün güçlü şekilde korunduğunu göstermiştir. Bununla birlikte oksidatif stres, inflamasyon, apoptotik indüksiyon gibi etmenlerden düşük düzeyde etkilendiği ve sağlıklı nöron görüntüsü oluştuğu görüldü. Travma sonrası artan TNF-alfa, Bax ve Caspase-3 düzeyleri için yapılan çalışmalardan elde edilen immunhistokimyasal sonuçlarda bu moleküllerin düzeylerinde yüksek dozlarda ciddi miktarlarda azalma saptanmıştır. MDA analizi sonuçlarına bakıldığında ise travma sonrası artan MDA düzeylerinde anetol uygulanan gruplarda ciddi azalma tespit edilmiştir.

SONUÇ: Yaptığımız bu çalışmada anetol travma sonrası uygulanmasında glial hücre miktarını arttırdığını bununla birlikte beyin dokusunun piramidal nöronlarında piramit üçgen görüntüsünün oldukça güçlü şekilde korunduğunu ve travmaya eşlik eden oksidatif stres, inflamasyon, ve apoptotik indüksiyon gibi etmenlerden düşük düzeyde etkilendiğini ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak Bax immunopozitivitesinde anlamlı bir azalma, Caspase-3 immunointensitesinde anlamlı bir azalma ve TNF-alfa düzeylerinde ciddi düzeylerde azalmalar olduğunu tespit edilmiştir. MDA analizi sonuçlarına bakıldığında ise travma sonrası artan MDA düzeylerinde anetol uygulanan gruplarda ciddi azalma tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler; Travmatik beyin hasarı, anetol, apoptozis

SUMMARY

DOSE-DEPENDENT PROTECTIVE EFFECT OF ANETOL IN EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY IS MEDIATED BY APOPTOTIC AND INFLAMMATORY PROTEINS EXAMINATION OF THEIR EXPRESSION IN TERMS OF OXIDATIVE STRESS

OBJECTIVES: Traumatic brain injury (TBI) is one of the leading causes of morbidity and mortality in all ages. More than 50 million people worldwide suffer from traumatic brain injury each year. The clinical features of TBI and the underlying complex pathophysiology increase the value of preclinical studies and phase I/II studies. However, a therapeutic method other than surgical intervention for the treatment of traumatic brain injuries has not yet been developed. The fact that Anetol has antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory and antihypernociceptive effects has made this vegetable oil gain an important place in recent studies. Findings on its strong antioxidant potential have provided data suggesting that Anetol may be protective in cardiac ischemia reperfusion injury. In our current study, we plan to investigate the protective effect of Anetol in the TBI model in a dose-dependent manner, thanks to its cheap herbal component and easy availability. In our literature review, there is no study to investigate the dose-dependent protective power of Anetol, which is an antioxidant component, in animals with TBI model. For this reason, this research has the potential to bring a new perspective to the TBI research topic.

MATERIALS AND METHODS: For this study, 35 adult male mice weighing 28-30 g were obtained from DÜSAM (Dicle University Health Sciences Application Research Center). These 35 animals were divided into 5 groups in equal numbers. After these groups were formed, the animals in the control group were not given any treatment for 72 hours. The animals in the trauma group were traumatized by weight reduction method and then only analgesia was applied without any application and followed up under optimal conditions and decapitation was performed after sacrifice at the end of the experiment. In the post-traumatic dose-dependent groups, the animals were firstly anesthetized with the help of xylazine and ketamine, then moderate traumatic brain injury was induced by free weight reduction method and 3 hours after the trauma was applied and for the following 72 hours on the same day and hour, 40mg/kg anethole for one group, 80mg/kg anethole for the other group and 160mg/kg anethole for the last group were administered by oral gavage. All experimental animals were sacrificed 1 hour after the last treatment doses. The collected brain samples were fixed in 10% buffered formalin solution and subjected to routine histologic follow-up. Paraffin embedded 5 µm thick sections were stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) for routine histopathologic evaluation. In addition, the expression levels of apoptotic proteins were examined by immunohistochemistry of

TNF-alfa, Bax, Caspase-3 in serial sections taken from brain tissues. Finally, biopsy samples were taken for MDA levels in the experimental study.

FINDINGS: In the control group, the brain tissue had normal morphology, was covered with meninges and contained abundant neurons and glial cells, but in the trauma group, intense hemorrhage and vascular congestion were observed. Pyknotic nuclei, karyolysis, increased perineural cavity and edema areas were observed in neuron cell bodies. Post-traumatic administration of 80mg/kg or more of anethole after trauma showed that pyknosis occurred but the pyramidal triangle image of pyramidal neurons was strongly preserved. However, oxidative stress, inflammation, apoptotic induction were affected at a low level and a healthy neuron image was observed. Immunohistochemical results obtained from studies on TNF-alpha, Bax and Caspase-3 levels after trauma showed a significant decrease in the levels of these molecules at high doses. When the results of MDA analysis were analyzed, a significant decrease was found in the anetol-treated groups in the MDA levels that increased after trauma.

CONCLUSIONS: In this study, we found that anethole increased the amount of glial cells in the post-traumatic administration of anethole, however, the pyramidal triangle image was strongly preserved in the pyramidal neurons of the brain tissue, and it was affected at a low level by factors such as oxidative stress, inflammation, and apoptotic induction accompanying trauma. In addition, there was a significant decrease in Bax immunopositivity, a significant decrease in Caspase-3 immunointensity and significant decreases in TNF-alpha levels. When the results of MDA analysis were analyzed, a significant decrease was found in the anetol-treated groups in the MDA levels that increased after trauma.

Keywords; Traumatic brain injury, anetol, apoptosis

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Travmatik beyin hasarı (TBH), her yaşta görülebilen morbidite ve mortalitenin önemli sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir(1,2). Tüm dünyada her yıl 50 milyonu aşkın insan travmatik beyin hasarıyla karşılaşmaktadır(3). 2005-2019 yılları arasında dünya genelinde 3 milyondan fazla insan travmatik beyin yaralanmasıyla nörolojik, psikososyal ve kalıcı sakatlığa kadar değişen posttravmatik komplikasyonlar ile karşılaşmaktadır(4,5). TBH'nın klinik özellikleri ve altında yatan kompleks patofizyoloji, özellikle klinik öncesi çalışmalarda, ayrıca faz I/II çalışmaların değerini daha da arttırmaktadır. Bu çalışmaların başarısı TBH'nın şiddetiyle bağlantılı olarak ümit verici terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açmıştır. Ancak şu durumda travmatik beyin yaralanmalarının tedavisine yönelik cerrahi müdahale dışında terapötik bir yöntem halen geliştirilememiştir(6). Kafaya darbelere bağlı beyin hasarı kabaca iki ana başlıkta ele alınabilir. TBH'ya bağlı hasarlar; mekanik hasara bağlı olarak meydana gelen primer hasar ve bu hasarı takiben ortaya çıkan sekonder hasar olarak sınıflandırılabilir. Primer travmatik beyin hasarı farklı mekanik etmenlerin aynı anda beyne etki etmesiyle ortaya çıkabilir. Bunun sonucunda bölgesel ve yaygın beyin hasarı meydana gelebilir. Primer travmatik beyin yaralanması, kafaya alınan darbe sonucu nöronal hasar meydana getirmesi ve bir dizi nöroinflamatuvar olaylar sonucu oluşur. Nöronal membranların manipülasyonu iyon geçişlerini kordine eder. Nöroinflamasyon, artan mikrogial aktivite ve önemli bir antioksidan bileşik olan mitokondriyal glutatyonun (GSH) tükenmesi ile aktive hale gelir. Glutatyonun azalmasıyla ve buna eşlik eden hücre içi kalsiyum iyon artışı, kaspaz aktivasyonuna ve nihai apoptoza yol açan mitokondriyal disfonksiyona neden olur(7,8). Travmatik beyin hasarını takiben sekonder hasarın, serbest radikal yaralanması, iltihaplanma ve glutamaterjik eksitotoksisite dâhil olmak üzere çoklu fizyolojik süreçler sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir(9,10). Ortaya koyulan çalışmalarda orta ve şiddetli beyin hasarı oluşan hastalarda her iki tip yaralanmanın birlikteliği insidansının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir buna ek olarak diffüz aksonal hasar(DAH), travmatik beyin yaralanması olan vakaların yaklaşık %70'inde gösterilmiştir(11). Travmatik beyin yaralanmasını takiben ilk 24 saatlik akut süreç

içerisinde kan beyin bariyeri'nin disfonksiyone olmasına bağlı olarak nötrofil, monosit ve lenfositler hasar alan beyin dokusuna infiltre olur buna ek olarak akut dönemde pro-inflamatuvar IL-1 β , IL-6 ve TNF-alfa düzeylerinin de önemli şekilde arttığı ortaya konulmuştur. Fas süperfamilyasının üyelerinden olan TNF-alfa düzeyindeki artış Fas ligand ile etkileşime geçilmesine ve travmatik beyin yaralanmasının olduğu beyin dokusunda kaspazların aktivasyonu sonucu apoptozis'in indüklenmesine sebep olur(12,13). Sekonder olarak meydana gelen travmatik beyin yaralanmasının iç ve dış apoptotik sinyal yollarında önemli fonksiyonları bulunan kaspaz 8 ve kaspaz 9'un aktivasyonu ile kaspaz 3'ün yarılandığı ve aktive olarak apoptozisin meydana geldiği belirtilmiştir(14,15).

Bugüne kadar olan kaynaklarda antioksidanların TBH'ya karşı protektif gücünü araştıran çok sayıda makale bulunmaktadır. Yapılmış olan araştırmaların bir kısmında antioksidan terapilerin travmatik beyin hasarının neden olduğu merkezi sinir sistemi komplikasyonlarının hafifletici gücüne vurgu yapmış olmasına karşın, günümüzde TBH'nın tedavisini destekleyici rutin klinik bir uygulama bulunmamaktadır(16). Anetol rezene(17) ve anason(18) gibi bitkilerde yüksek oranda bulunan bir uçucu yağ olup farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine yönelik bilimsel araştırma sonuçları bulunmaktadır. Yapılmış olan araştırmalarda Anetol'ün antioksidan, antikanserojenik , anti-inflamatuvar ve antihipernosiseptif etkisinin olması bu bitkisel yağın son dönemlerde araştırmalarda önemli bir yer edinmesini sağlamıştır(19). Güçlü antioksidan potansiyeline yönelik bulgular Anetol'ün kalp iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu olabileceğine yönelik veriler sunmuştur(20). Anetol'ün ayrıca izole aorta kontraktilesi üzerinde bimodal bir etkiye sahip olduğu ve TBARS düzeylerini düzenleyici bir antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir(21,22). Ucuz bir bitkisel bileşen olması ve kolay elde edilebilirliği sayesinde mevcut çalışmamızda Anetol'ün TBH modelinde koruyucu etkisini doz bağımlı şekilde araştırmayı planlamaktayız. Yaptığımız literatür taramasında antioksidan bir bileşen olduğuna yönelik veriler bulunan Anetol'ün TBH modeli oluşturulan hayvanlarda doz bağımlı koruyucu gücünün araştırılmasına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple söz konusu araştırma TBH araştırma başlığına yeni bir bakış açısı kazandıracak potansiyel taşımaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1- Travmatik Beyin Yaralanmaları

2.1.1- Travmatik Beyin Yaralanmalarında Tanımlama ve Tarihçe

Güncel tanımlamalara göre travmatik beyin yaralanmaları(TBY); beyin dokusunun yapı ve işlevlerinde kafaya dışarıdan gelen herhangi bir darbe sonucu ortaya çıkan geçici veya kalıcı fonksiyon kaybı olarak tanımlanır(23).

Kafa travmasına ait yapılan en eski çalışma M.Ö 2800'lü dönemlere dayanmakta olup ilk bulgular mısırlı bir hekim olan İmhotep tarafından tanımlanmıştır ve travmatik beyin yaralanmaları olan hastaları tedavi olur, tedavi olabilir ve tedavi olamaz diye sınıflamıştır(24). Tarihte İnkâ İmparatorluğu dönemine ait olduğu düşünülen kafaya delik açılarak tedavi edilen travmatik beyin kanamalarının olduğuna dair kanıtlar yer almaktadır(25). 19.yy zamanlarında kafa travmasının patofizyolojisi Lcew ve Tönnis tarafından kaleme alınmıştır(25).

Amerika'da daha önceden şüpheli olgularda kafaya delik açılması yöntemi 1970 sonrası bulunun beyin tomografisi yöntemiyle yerini görüntüleme yöntemlerine bırakmıştır(26). 1972 yılında daha gelişmiş bir cihaz olan manyetik rezonans bulunması ile travmatik beyin hasarlarının boyutları daha detaylı olarak tanımlanmaya başlanmıştır(26).1974 yıllarında Jenet ve Teasdale'nin birlikte tanımladığı Glaskow Koma Skalası(GKS) geçmişten günümüze travmatik beyin hasarlı hastalarda travmanın boyutu ve hastanın klinik ilerleyişi ile ilgili önemli bilgiler vermeye devam etmektedir(26).

2.1.2- Travmatik Beyin Yaralanmalarında Epidemiyoloji

Travmatik beyin yaralanmaları ve bu yaralanma nedeniyle ortaya çıkan hasarlanmalar toplumun her yaştan kesimini ilgilendiren ve tüm dünyada sık görülen önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir(27). Dünyada her yıl travmatik beyin yaralanması yaklaşık olarak 50 milyonun üzerinde meydana gelmektedir(28).

Dünya sağlık örgütü(DSÖ) tarafından yapılan çalışmalar ışığında travmalara bağlı tüm dünya genelinde 100 binde ortalama 83,7 olarak gösterilmekte iken

ülkemizde bu oran 100 binde 120 civarında gösterilmektedir. Bu meydana gelen ölümlerin yaklaşık olarak %30'u kafa travmalarına ait olup yapılan son çalışmalarda bu oranın %50'lere çıktığı ortaya koyulmuştur(27).

Kafa travmaları toplumların yaşı, ırkı, cinsiyeti, sosyokültürel ve sosyoekonomik faktörlerden etkilenmektedir. Kafa travması daha çok genç popülasyonda özellikle de 15-25 yaş arası bireylerde görünmektedir. Trafik kazaları ülkemizde bu popülasyonu en çok etkileyen travma nedeni olarak göze çarpmaktadır. İkinci sıklıkla düşmeler gelmekte bunları takiben en sık travma şekli ise ateşli silah yaralanmaları olarak devam etmektedir(29,30,31). 15-25 arası yüksek olan bu travmalar 25-60 yaş arasında bir nebze olsun azalma gösterse de 60 yaş üzerinde bu travmalar tekrar yükseliş göstermektedir(31).Kafa travmaları açısından bebeklik ve çocukluk yılları daha yüksek risk teşkil etmesine rağmen 75 yaş ve üzerinde bu travmalar daha yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır(31).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda travma genç nüfus ölümlerinde ilk sırada yer almaktadır. Kafa travması ise bu ölümlerin yüzde ellisinden fazlasından sorumludur. Fakat sadece genç nüfus değil de tüm popülasyon ele alındığında kalp damar hastalıkları ve tümörlerden sonra üçüncü en sık neden olarak dikkat çekmektedir(32).

2.1.3- Travmatik Beyin Yaralanmalarında Sınıflandırma

Travmatik beyin yaralanmalarına sebep olan olaylardan bağımsız bir şekilde; olguların bilinç düzeyi ve hasarın anatomik lokasyonuna göre sınıflandırma yapılır. Travmatik beyin yaralanmalarından sonra GKS(tablo-1) kullanılarak hastaların klinik durumu ve bilinç düzeyi değerlendirilir(33).

Tablo 1: Glaskow Koma Skalası

Glasgow Koma Skalası

Cevap	İnfant	Çocuk ve yetişkin	Puan
Göz açma E-EYES	Spontan	Spontan	4
	Sesli uyarana	Sesli uyarana	3
	Ağrılı uyarana	Ağrılı uyarana	2
	Yok	Yok	1
Sözel cevap V-VERBAL	Anlamsız sözler	Oryante ve yeterli	5
	İrritabl, ağlıyor	Uygunuz konuşma	4
	Ağrı ile oğloma	Yetersiz kelimeler	3
	Ağrı ile inleme	Anlamsız sözler	2
	Yok	Yok	1
Motor cevap M-MOTOR	Normal spontan hareket	İstekleri yapma	6
	Dokunma ile çekme	Dokunma ile çekme	5
	Ağrı ile çekme	Ağrı ile çekme	4
	Dekortike postür	Dekortike postür	3
	Deserebre postür	Deserebre postür	2
	Yok	Yok	1
Total Skor			3-15

Gks baz alındığında;

GKS<8 olan olgular; ağır travmatik beyin hasarlanması olarak isimlendirilir. Hasta koma halindedir. Ölüm ve sakatlık oranı en yüksek gruptur ve mutlak yoğun bakım ünitelerinde takip ve tedavi gerektirmektedir.

GKS 9-13 olan olgular; orta düzey travmatik beyin hasarlanması olarak isimlendirilir. Bu grupta bölgesel travmatik hasarlanma görülebilir. 5 dakikadan daha uzun süren bir farkındalık kaybı mevcuttur. Bu grup içinde yoğun bakım ünitelerinde yatış gerekebilmektedir.

GKS 14-15 olan olguların bulunduğu hafif beyin hasarlanması olarak adlandırılan bu grupta ise farkındalık kaybı 5 dakikadan daha kısa sürmekte olup geçici farkındalık kaybı olarak nitelendirilir. Çoğu zaman nörolojik hasar görülmeyebilir. Travmaların %75'inden fazlasından görülür.

Travmatik beyin hasarlamalarının morfolojik olarak sınıflandırılması

A- Cilt Yaralanmaları

B- Kafatası Kırıkları

- 1- Lineer fraktürler
- 2- Çökme fraktürleri
- 3- Kafa kaide kırıkları

C- Bölgesel Beyin Yaralanmaları

- 1- Kontüzyon/İntraserebral Kanama
- 2- Epidural Kanamalar
- 3- Subdural Kanamalar

D- Yaygın Beyin Yaralanmaları

- 1- Konküzyon
- 2- Diffuz Aksonal Hasarlanmalar

E- Herniasyon ve Beyin Ödemi

Travmatik Beyin Hasarlarının Travma oluş mekanizmasına göre Sınıflandırılması

A- Künt Travmalar

B- Penetran-balistik Travmalar

Travmatik Beyin Hasarlarının Travma şiddetine göre Sınıflandırılması

A- Hafif Şiddetli: GKS; 14-15 olarak ifade edilen kısım

B- Orta Şiddetli: GKS; 9-13 olarak ifade edilen kısım

C- Ağır Şiddetli: GKS; 3-8 olarak ifade edilen kısım

Travmatik beyin hasarlanmalarının zamanlamaları göz önüne alınarak primer beyin hasarlanması ve sekonder beyin hasarlanması olarak iki kısımda incelenir (34).

2.1.3.1. Primer Beyin Hasarlanmaları

Travmanın olduğu ilk anda başlayan ; travmanın direkt etkisiyle veya dolaylı yollarla beynin nöral dokularını hasarlamasıdır. Beynin nöral yapılarında oluşan bu hasarlanma ya nöral dokuları penetre eden yabancı cisim tarafından ya nöral dokunun kemik kaideye çarpması sonucu ya da kafatası kırıklarının direk nöral dokuya teması sonucu meydana gelir. Dolaylı yaralanma da ise ileri derece akselerasyon-deselerasyon ile beynin ak madde bağlantılarında kopukluklara neden olarak hasar meydana getirir (35).

2.1.3.2. Sekonder Beyin Hasarlanmaları

Bu hasarlanma tipinde ise primer beyin hasarını takip eden süreçte vücudun primer hasarlanmaya verdiği reaksiyon olarak göze çarpmaktadır. Primer hasarı takiben meydana gelen hücre ölümleri, mikrodolaşım bozulmaları ile bu nöral hasarlanmalar oluşur. KİBAS, hipotansiyon, hipoksi, taşikardi gibi sekonder yaralanmalar primer hasarlanmayı takiben vücudun meydana getirdiği fizyolojik değişikliklerin sonucudur (36).

Primer Beyin Hasarlanmalarının Morfolojik Sınıflaması

A-Cilt Yaralanmaları

Kafatasında meydana gelen cilt yaralanmaları travma lokalizasyonu ile ilgili bilgi vermektedir. Aşırı derecede kanlanması mevcuttur. Bu aşırı kanlanma özellikle yenidoğan döneminde ve erken çocukluk döneminde hayatı tehdit eden ciddi kanamalara neden olmaktadır hatta hemorajik şok tablosu bile görülebilmektedir.

B-Kafatası Kırıkları

- 1- Lineer Fraktür:** Darbenin uygulandığı kuvvetin kemik kuvvetini geçtiği yerde başlar lineer bir hat boyunca devam eder. Darbe kuvvetinin bittiği yerde ise sonlanır.
- 2- Çökme Fraktürü:** Kafatası kemiklerinde meydana gelen travma sonucu kafatası kemiğinin nöral dokulara çökmesi sonucu meydana gelir. Bu çökme fraktürleri ikiye ayrılır. Tam kat çökme kemikleri çoğu zaman cerrahi yöntemlerle ile düzeltilir. Tam kat olmayan çökme ise dura laserasyonu ya da açık kırık olması durumlarında enfeksiyonu önlemek ve nöral dokuları korumak amacıyla cerrahi planlamaya alınır.
- 3- Kafa Kaide Fraktürü:** Travma sonucu fraktür hattından kafa kaidesine doğru fraktür hattının ilerlemesi sonucu oluşur. Bu tür travmalarda rakun gözü bulgusu göz çevresinde ekimoz ve kulak arkasında battle sign görülür. Bu travmalara maruz kalan hastalarda rinore ve otore oluşabileceği ve bunun hayatı tehdit eden menenjit oluşturabileceği göz önünde bulundurularak mutlak olarak menenjit profilaksisi verilmesi gerekmektedir. Bu hastalarda fasiyal paralizi de görülebileceği unutulmamalıdır.

C-Bölgesel Beyin Yaralanmaları

- 1- Kontüzyon/İntraserebral Kanama:** Travmatik bölgenin olduğu yerin altındaki dokuya direkt hasar vermesi sonucu meydana gelir. Kontüzyonda pia tabakası ve araknoid membran sağlamdır. İntraserebral kanama ise

kontüzyonların büyümesi olarak tarif edilir. Daha çok frontal bölgede ve temporal bölgede görülür daha az sıklıkla ise serebellar bölgede görülür. Bölgesel yaralanmalar travmanın bulunduğu alanda olabileceği gibi tam karşı tarafında da görülebilir(37).

- 2- **Epidural Kanamalar:** Travmaya bağlı olarak dural arter veya venlerden ve bazen diploik venlerde oluşan hasar sonucu kemik ile duramater arasında kan birikmesi ile oluşan hasarlanma şeklidir. En sık arteria meninge media sorumlu tutulmaktadır. Arteriyel kanamalar nörolojik tabloda ani bozulmalara neden olduğu için hızlı tanı ve tedavi gerektirmektedir(38).
- 3- **Subdural Kanamalar:** Bu yaralanma türü ise travma sonucu dura ile parankimal doku arasında bulunan köprü venlerin hasarlanmasıyla dura ve beyin parankimi arasında bulunan alana kanamalar ile kendini göstermektedir. Mortalitesi %60-80'leri bulmaktadır. Akut, kronik, subakut formları mevcuttur(38,39).

D-Yaygın Beyin Yaralanmaları

- 1- **Konküzyon:** Kafaya alınan darbe sonucu beynin tamamını etkileyen ve diplopi, baş ağrısı, kusma gibi bulgularla kendini gösteren geçici farkındalık kaybı olarak tarif edilir.
- 2- **Diffuz aksonal Hasarlanmalar:** Şiddetli travma sonucu beynin ak maddesinde yaygın hasar meydana gelmesi durumudur. Bu tip hasarlanmalar özellikle kafanın sağa-sola hareketi sonucu falks ve tentoriumun aşırı gerilmesi sonucu meydana gelir(40).

Yapılan çalışmalarda akson hasar oluşumunda aksonal ileti bozuluğu, organel birikimi ve nöroflaman birikiminin sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Travmanın başlangıç zamanında görülmeyen fakat ilerleyen saatlerde ortaya çıkan wallerian dejenerasyonu aksonun proksimal ve distal kısım arasındaki bağlantının kopması olarak ifade edilir. Ortaya çıkan değişiklikler ilk olarak ranvier boğumunda görülür. Çünkü aksonun en zayıf noktası burasıdır. Küçük boyutlu aksonlar direkt hasara maruz kalırken büyük boyutlu olanlar organel birikimi sonucu şişer ve daha sonra hasara

uğrar. Bu aksonal ayrışma olarak isimlendirilir ve sekonder aksonal hasar olarak değerlendirilir. Kafa travmaları da aksonal hasara önemli bir örnektir(41).

Diffuz aksonal hasar 3 merhaleye ayrılmıştır. İlk aşamada hasar beyin lobunun parasagittal ak maddesi ile sınırlıdır. Bunu takip eden aşamada ise korpus kallozum da etkilenen kısmın içine girmiştir. Son aşamada bu patolojilere ek olarak beyin pedikülleri de eklenmiştir(42). Diffuz aksonal hasarlanmada travmanın ilk saatlerinde beyin tomografisinde anlamlı herhangi bir bulgu çoğu zaman yoktur. Daha sonradan korpus kallozum, beyin sapı gibi bölgelerde özellikle ak-gri madde birleşim yerinde küçük kanamalar dikkat çekmektedir(42).

E-Herniasyon ve Beyin Ödemi

- 1- **Herniasyon:** Beyin dokusunun olduğu yerden başka bir yere yer değiştirmesi olarak ifade edilir. Hayatı tehdit eden ciddi bir patolojidir bu yüzden ki erken tanı ve tedavisi oldukça önemlidir. Kafa travması şiddeti artan KİBAS ile oldukça yakın ilişkilidir. Beyin ödeminin nörokimyasal özellikleri artan KİBAS'a bağlı olarak herniasyon görülür(43).
- 2- **Beyin ödemi:** Beyinde sıvı birikimi ve beyin hacminde meydana gelen artış olarak tanımlanır. Kanserler, metabolik bozuklular, toksinler, travma, enfeksiyon beyin ödemi etyolojileri arasında yer almaktadır(44).

Beyin kapalı bir sistem olan kafatası kemiği içinde yer alması dolayısıyla yapılardan birinin hacminin artması ile diğer bir yapının hacminin azalması gerekmektedir. Bir denge içinde olmalıdır. Oluşan bu denge Monro-Kelie doktrini ile ortaya koyulmuştur. Beyin sıvı miktarında artış ilk olarak araknoid villuslar yardımıyla BOS'un spinal aralıklara gönderilmesi ile başlar. Fakat bu artış kompanse edilmezse herniasyon kaçınılmazdır(45).

6 çeşit beyin ödemi tipi tariflenmektedir:

- a- **Vazojenik ödem:** Beyin tümörü, abse gibi nedenlere bağlı olarak kan-beyin bariyeri hasarlanması sonucu hücre geçirgenliği artmasıyla hücre sıvı dolup şişmesiyle meydana gelir.

- b- Sitotoksik ödem:** İskemi, toksin gibi hücre zarını direkt olarak hasarlayan ve iyon kanallarının hasarlanması sonucu direkt hücre hasarı ile kendini göstermektedir(46).
- c- Hidrostatik ödem:** AVM operasyonu sonrası gibi AVM çıktıktan sonra artmış vasküler basınç sonucunda damar dışına sıvı çıkışı ile karakterize ödem şeklindedir. Bu çıkan sıvı vazojenik ödemin aksine proteinden fakir yapıdadır.
- d- Hipoozmotik ödem:** Uygunsuz ADH sendromu, serebral tuz kaybı gibi hiponatremi ile sonuçlanan bu gibi durumlarda sıvının damar içinde tutulmaması sonucu sıvının damar dışına kaçması ile ortaya çıkan ödem tipidir.
- e- İnterstisyel ödem :** Herhangi bir nedene bağlı olarak ortaya çıkan hidrosefali sonucu BOS akımının bozulması sonucu transependimal BOS geçişine bağlı görülen ödem tipidir.
- f- Beyin şişmesi :** Artan kan hacmi ile karakterize olan beyin ödemi türüdür(46).

2.1.4- Travmatik Beyin Hasarı Belirteçleri

MBP, CTP, GFAB, S100B en sık görülen ve kullanılan travmatik beyin hasarı belirteçleri olarak karşımıza çıkmaktadır.

MBP; myelin kılıf olarak adlandırılan ve aksonları çevreleyen yapının esas oluşum proteindir. Merkezi sinir sisteminin gelişim basamaklarında görev yaptığı ve myelin dejenerasyonu ile giden hastalıkların oluşumunda rol aldığı gösterilmiştir(47). Multiple sklerozun ortaya çıkmasında bu proteine karşı oluşmuş olan otoantikör cevabı gösterilmiştir(48). Beyin omurilik sıvısında artan bu protein düzeyi spinal demiyelinizasyonda önemli bir belirteç haline gelmiştir(49).

CTP; mikrotübül etkileşimi olan ve tau nöron aksonlarının yapısında yer alan önemli bir proteindir. Bu protein aksonlarının yapı iskeletinden sorumludur. Aksonların mikrotübüllere bağlanır. Diffüz hasar meydana gelen hastalarda beyin omurilik sıvısında CTP oranlarının yükseldiği tespit edilmiştir(50). Shaw ve arkadaşları; travmatik beyin yaralanması ile başvuran hastaların CTP düzeylerinin ölçümü yapılmış. Yapılan bu ölçümde CTP düzeyleri yüksek ölçülen hastaların

tomografi bulgularının pozitif olduğu ve bu hastaların hastane yatış süreleri ile bu süre zarfında ölüm oranlarının yüksekliği ile birliktelik gösterdiği saptanmıştır(51).

GFAP; özellikle astrosit ara flaman elemanı olarak görev yapmakta olan bir proteindir. Demiyelinizan hastalıklarda ve travmatik beyin yaralanmalı hastalarda yüksek düzeyde tespit edilmiştir(52).

S100B; S100 proteini çok geniş bir etki alanına sahip olan düşük molekül ağırlıklı bir protein grubunu oluşturmaktadır. Spesifik alt grupları mevcuttur. S100B beyin dokusunda daha hakim olan subtipidir. Çok düşük düzeylerde(nanomolar) nöron gelişimini uyardıkları tespit edilmiştir. Nöronların sağkalımını arttırmakta önemli bir yer tutan önemli bir protein grubudur. Oksidatif strese karşı nöroprotektif etkileri oldukları da bilinen özelliklerindendir. Düzeylerindeki değişiklikler(mikromolar düzeye çıkmaları) belli bir düzeyi aştıklarında inflamasyonu tetikler ve apoptotik yolağı harekete geçirerek nöronal hasara neden olurlar(53). P53 apoptozisi uyaran bir yapıdır. S100B; P53 genini baskılayarak P53'ün apoptozisi uyarmasına engel olur ve bu yolla apoptozis oluşumunu engellemiş olur. Kardiyak cerrahilerde yükselmesi, malign melanoma, şizofreni, Alzheimer durumlarında kanda yüksek tespit edilmiştir olup geniş bir kullanım alanı mevcuttur. Açlıkta, asidoz, anemi gibi nöronal hasarın olmadığı durumlarda da yükselmesi bu proteini spesifik nöronal hasarı göstermekte tartışmalı hale getirmektedir(54).

Yukarda anlatılan tüm bu belirteçler içinde S100B proteini her ne kadar nöronal hasarı göstermekte tartışmalı olsa da hem serum düzeyi hem de BOS düzeyi yükselen ve bu yüksekliğin GKS düşüklüğü ile korelasyon göstermesi bu proteini diğer belirteçlerden öne çıkaran özelliğidir(55).

2.1.5- Travmatik Beyin Hasarında Patofizyolojik Süreçler

Travmatik beyin yaralanması ile primer ve sekonder hasarlanma oluşmaktadır. Primer yaralanmada hücresel düzeyde direkt etkilenme sonucu nöroglial hasar oluşmuş iken; sekonder yaralanmada ise travmadan hemen sonra başlayan hücre ölümüne kadar geçen yolda hücrenin maruz kaldıklarının geçtiği süreci kapsamaktadır. Travma sonrası oksidatif stres, mitokondrial bozulmalar ve eşlik eden

iskemik süreç, nöroinflamasyon, nörotransmitter salınımı gibi bir takım sekonder oluşum hasarı olarak kendini gösterir(56,57). Oluşan patofizyolojik süreçler aşağıda sıralanmıştır.

2.1.5.1. Oksidatif Hücre Hasarı Mekanizmaları

Travmatik beyin yaralanmaları sonrası meydana gelen hasar mekanizmaları içinde oksidatif stres önemli bir yer tutmaktadır. Nöronlar oksidatif strese vücudumuzdaki diğer hücrelere göre daha hassastır. Çünkü hücre zarlarının lipid yönünden daha zengin olması, membran yoğunluğunun daha fazla olması, anti-oksidan yoğunluğunun nispeten daha az olması bu nöronal hücreleri oksidatif hasara karşı daha duyarlı hale getirmektedir(58).

Beyinde oksidatif yolak mekanizması oldukça fazladır. Bu oksidatif stres yolları reaktif oksijen radikalleri üretimi yönünden oldukça zengindir. Reaktif oksijen radikallerinin oldukça geniş üretim yolları mevcuttur. Bu yollar içerisinde en önemli yeri araşidonik asit yolağı oluşturmaktadır. Bu oluşum mekanizmasında; aşırı glutamat salınımı sonucu kalsiyum hücre içinde artar ve lipaz enzimleri aktif hale gelir. Lipaz enzimleri hücre membran ana bileşeni olan araşidonik asiti parçalar. Bu parçalanma sonucu ortaya lökotrien, prostoglandinler, tromboksanlar gibi bileşikler çıkar. Bu çıkan bileşiklerden de reaktif oksijen radikalleri üretilir(59).

Hücre zarı araşidonik asitten oldukça zengin ve oksidasyona oldukça duyarlıdır. Oksijenli ortamda reaktif oksijen radikalleri hücre zarının yapısındaki doymamış yağ asitlerinin ihtiva ettiği çift bağları hasarlayarak; hücre zarının bütünlüğünün kaybolmasına ve seçici-geçirgen özelliğinin ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre membran potansiyeli etkisini yitirir. Bu yitirme ile hücre içine aşırı iyon girişi ve bununla beraber hücre içine su girişi ile hücre şişer ve gerilir. Bununla beraber kalsiyum iyonu lipazları aktifleyerek hücre içinde hücre membranı başta olmak üzere tüm organellerde hasar meydana getirerek hücrenin ölümünü tetiklemektedir(60).

2.1.5.2.Eksitoksisite hücre hasarı mekanizmaları

Travmatik beyin hasarlanması sonucu primer hasarlanmayla nöronlarda aşırı düzeyde depolarizasyon ve glutamat başta olmak üzere aşırı aminoasit salınımı görülür(61,62). Hücre dışına aşırı glutamat salınımı sonucu nöron hücre zarlarında aşırı uyarılma sonucu reseptörlerden fazla miktarda Ca, Na, K, salınır. Aşırı Ca salınımı ister fizyolojik olsun ister patolojik olsun direkt olarak apoptozisin başlamasına neden olur. Na, K gibi iyonların salınımı ise hücre içinde iyon gradiyentini bozar. Bu gradiyent bozulmasını dengelemek için Na/K ATPaz aktivitesine ihtiyaç duyulması ile hücrenin zaten artmış olan metabolik ihtiyacı daha da artar ve kısır bir döngü içine girer(63).

Meydana gelen bu iyon değişiklikleri sonuç olarak hücrenin metabolik gereksinimlerinin artmasına, membran hasarlarına ve kan beyin bariyeri hasarlanmasına kadar giden yıkım süreçlerinin tetiklenmesi ile nöronal hasara neden olmaktadır (64).

2.1.5.3.Nöroinflamatuvar Hasar Mekanizması

Travma oluşumu sonrası hem primer hem de sekonder hasarlanmada çeşitli proinflamatuvar mediyatörlerin salınımı meydana gelir. Bu mediyatörler daha sonra adeziv proteinleri ve çeşitli kemokinleri aktive eder. Bunlar nöroglial hücre ve immün sistem hücrelerinin senkronize çalışmalarını sağlar(65). Gerçekleşen inflamatuvar sürece yanıt olarak hem hasarlı dokuda hem de çevre dokuda etkilenmeler meydana gelir. Bunu takip eden süreçte ise astrositler nötrofinler ve mikroflamanlar salgılayarak o bölgede skar dokusu meydana getirir(66). Travmanın ilk aşamasında önce mikroglia hücreleri stimüle olur; nötrofil hücreleri o bölgeye doğru hareket eder. IL-1b, IL-6, TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokin artışı meydana gelir(67). Hasarlanmanın ilk zamanları her ne kadar nötrofil hakimiyetinde olsada 72 saatten sonra bu hakimiyet yerini makrofajlara bırakmaktadır(68).

Mevcut nöroinflamatuvar hasarlanmalar; sonuç olarak çeşitli proteaz enzimleri aktive hale gelerek bunu takip eden süreçte doku hasarı, ödem ve nöronal ölümün hızlanması ile neden olur.

2.1.5.4.Hücre Ölüm Mekanizması

Travmaya uğramış hücre ölümlerinde iki tip mekanizma mevcuttur. Bunların ilki apopitozis olarak tanımlanır. Apopitozis; ölümü dokunun devamlılığı için çok önemli olan enerji gerektiren programlı bir hücre ölümüdür. Nekroz ise; enerji gereksinimine ihtiyaç duymayan geri dönüşümsüz bir hücre ölümü mekanizmasıdır(69).

Apopitozis ve nekrozda oluşum mekanizmaları farklılık gösterdiği gibi oluşuma neden olan etmenlerde farklılık göstermektedir. Apopitozis etyolojisinde; hücre yaşlanması, radyasyon, steroid, sitotoksik T lenfositler, HIV, kanser ilaçları gösterilirken nekroz etyolojisinde; hipoksi, hipertermi, iskemi, şiddetli oksidatif stres gösterilmektedir(70).

Apopitozis ve nekroz oluşum mekanizmaları morfolojik olarak da farklılıklar içermektedir. Apopitozis; hücre membran bütünlüğü bozulmamış, membrandan tomurcuk şeklinde ortaya çıktığı gözlemlenir. Apopitozis de kromatinler nükleer membran etrafına toplanır ve yoğunlaşır. Hücre gittikçe küçülür. Organellerin bütünlükleri zarları korunduğu için korunur. Membranı sağlam olan hücre daha sonra apopitotik cisimciklere dönüşerek süreç tamamlanır. Nekroz da ise; hücre membran bütünlüğü bozulur, hücre şişer ve organellerin bütünlüğü bozulur. Kromatinler topaklaşır ve hücre büyük vakuoller haline gelerek hücre ölümü gerçekleşir.

Apopitozis ve nekroz biyokimyasal olarak incelendiğinde; apopitozis de enerji gereksinimine ihtiyaç duyulurken nekroz da gereksinim duyulmaz. Apopitozis inflamasyon oluşturmazken nekroz inflamasyon oluşturur. Apopitozis de DNA kırılımları programlı iken nekrozda rastgeledir. Apopitozis tek tek ya da birkaç hücre ile gerçekleşirken nekroz grup halinde gerçekleşir (71).

Apopitozis; hücrelerin enerji ihtiyacı duyarak programlı bir şekilde ölmesi olarak tanımlanır. Fizyolojik bir süreç olan bu apopitozis mekanizmasında meydana gelen herhangi bir hasar belirli bir takım hastalıkları beraberinde getirir(72). Apopitozis 5 farklı yolla gerçekleştiği bilinse de iç sinyaller ile meydana gelen mitokondriyal yolak ve dış sinyaller ile meydana gelen ölüm reseptör yolağı en sık bilinen yolaklardır(73).

Mitokondriyal yolak; DNA hasarı, mtDNA hasarı, oksidatif stres gibi durumlarda devreye giren yolaktır(74). Mitokondriyal yolakta görev alan en önemli proteinler Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 hem anti-apoptotik hem de proapoptotik özelliklere sahiptir. Bcl-2 ailesi hücrenin apoptozise girip girmeyeceğini belirleyen bu yolağın modulator proteinleridir(75). Bcl-2 ailesinin hem apoptozisi inhibe eden hem de stimüle eden proteinleri bulunmaktadır. Stimüle edenlere; BAD, BAX, BAK, Bcl-Xs örnek olarak verilebilirken inhibe edenlere; Bcl-X₁, CED-9, E1B-19K, Bcl-2 örnek olarak verilebilmektedir. Hücrenin yaşayıp yaşamayacağına bu ailenin içindeki proteinlerin meydana getirdiği denge karar vermektedir(76).

BAD ve BAX proteinleri proapoptotik proteinler olup mitokondri dış zarında gözenekler oluşturabilen Bcl-2 ailesinin üyeleridir. Mitokondri dış zarında bulunan BAD ve BAX proteinleri eksprese olur ve Apaf-1 proteinine bağlanır. İntrensek hasar olduğu zaman Apaf-1 serbest hale gelir ve mitokondri membran permeabilitesi artar. Permeabilite artışı ile sit-c proteini sitozole salınır. Sitozole geçen sit-c proteini Apaf-1 ve Kaspaz-9 molekülleri ile kompleks oluşturur. Apoptozom olarak adlandırılan bu kompleks ile kaspaz sistemi aktive olur(77,78).

Ölüm reseptör yolağı; bu yolak aynı zamanda ekstrinsek yolak olarak da adlandırılır. Aktive T hücreleri, makrofajlar, NK(naturel killer) hücrelerinin apoptozise gidecek olan hücrenin zarında bulunan ölüm reseptörlerine bağlanması ile aktive olan yolaktır. Fas ve TNF reseptörleri birer integral proteindir. Bunlara Fas-L ve TNF-alfa bağlanması sonucu prokaspaz-8 kaspaz-8'e dönüşür ve bu şekilde ölüm reseptör yolağı aracılığıyla kaspaz sistemi aktive olur.(79).

Mitokondriyal yolakta meydana gelen kaspaz-9 ve ölüm reseptör yolağında meydana gelen kaspaz-8 daha sonradan kaspaz-3 ve bunu takip eden süreç de ise kaspaz-6 ve kaspaz-7 proteinlerini aktive ederek apoptozisi gerçekleştirir(80).

2.1.6-Travmatik Beyin Yaralanmalarında Deney Hayvanları Modelleri

Travmatik beyin hasarı ile gelen hastaların moleküler düzeyde beyin dokularının incelenmesinin mümkün olmaması ve daha önceden herhangi bir nihayete erdirilmemiş ya da hiç denenmemiş ilaçların travmatik beyin yaralanmalı hastalarda kullanılamayacağı için hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Travmatik beyin hasarlanması olan hastaların travma oluşum mekanizmalarını , bunun meydana getirdiği sonuçları ve kullanılabilecek ilaçların etkilerinin gösterilmesi için tekrardan bu hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır. Güncel durumda kullanılan modeller şu şekilde sıralanmaktadır:

1. Direkt Travmatik Beyin Hasarı Modeli
2. Serbest Ağırlık Düşürme Modeli
3. Tekrarlayıcı Hasar Modeli
4. Sıvı Perküsyon Hasar Oluşturma Modeli
5. Kontrollü Kortikal Beyin Hasarı Modeli
6. Penetran-Balistik Hasar Modeli

Direkt Travmatik Beyin Hasarı Modeli

Direk hasar oluşturma modeli Feeney ve arkadaşları tarafından oluşturulan bir düzenek şeklindedir. Bu düzenekte hayvanların kafatası kemiği ister kaldırılınsın ister kaldırılmasın ağırlık direkt olarak hayvanın kafasına düşürülerek hasar oluşturulmaktadır. Burada oluşan hasar ve travmanın şiddeti düşürülen cismin özgül ağırlığı ve bırakıldığı yüksekliğe bağlı olarak değişiklik göstermektedir(81).

Serbest Ağırlık Düşürme Modeli

Marmaraou ve arkadaşları tarafından tasarlanan bir model olan serbest ağırlık düşürme modelinde de yükseklik ve cismin özgül ağırlığı travmanın meydana getirdiği hasar boyutunda önemli bir yer tutmaktadır(82). Bu düzenekte yaklaşık olarak 1 metre yükseklikten ve 400-500 gram ağırlık düşürülerek travma oluşturulmayı hedeflemektedir(83). Oluşturulan bu düzenek ile deneklere ağır bir travma meydana getirilmektedir(82). Mice tipi deneklerde hayvan boyutu küçük olduğundan ağırlık ve yükseklikler daha düşük tutularak düzenek hazırlanır.

Bu düzenek modelinde belirli bir yükseklik ve belirli bir ağırlıktaki cisim serbest olarak belirli bir tüp içerisinden hayvanın kafasına düşürülerek travma oluşturulmaktadır. Deney hayvanına anestezi yapılır ve daha sonra orta hattan geçecek şekilde insizyon yapılır. Hayvanda kafatası kırığı oluşumunu engellemek amacıyla

elik bir plaka kafatasına sabitlenir. Sonrasında istenilen yükseklik ve ağırlıklarla travmatik hasar oluşturulur(82,84). Bu hasar tipinde ağır travma meydana geldiğı için hem akson hem de dentrit tarafında hasar oluşmaktadır(84). Beyin sapı dahil beyin orta hattındayer alan optik sinir ve korpus kallosum da hasar gören yapılar arasında yer almaktadır.

Tekrarlayıcı Hasar Modeli

Bu hasar modeli özellikle profesyonel olarak sporla insanların maruz kaldığı hafif ve tekrarlayıcı travmaların neticesinde geliştirilmiştir. Bu modelde hafif ve sık aralıklarla travma oluşturma amaçlanmıştır. Bu hafif travmaları oluşturmak için aralıklı tekrarlayıcı ağırlık düşürme, sıvı-perküsyon veya momentum değişim modelleri kullanılmaktadır(85). Momentum değişim modeli havalı bir piston kullanılarak oluşturulan hafif bir travma modelidir(86).

Sıvı Perküsyon Hasar Oluşturma Modeli

Sıvı perküsyon hasar oluşturma metodu son zamanlarda en yaygın başvurulan travmatik beyin hasarı modellemesi olarak göze çarpmaktadır. Bu modelde öncelikle hayvana kraniotomi yapılır ve düzeneğe yerleştirilir. Modelde sarkaç sistemi kullanılarak sarkacın pistona çarpması ile su hareketleri oluşturulur. Meydana getirilen bu su hareketleri yardımı ile kraniotomi defektinin olduğu bölgedeki beyin zarının olduğu kısma su değmesi sonucu hasar oluşturulur(86,87). Hasar boyutu sıvı dalgasının siddeti ile koreledir(88). Meydana gelen hasar bölgesel kortikal kontüzyonlar ve yaygın subkortikal hasarlardır(89).

Kontrollü Kortikal Beyin Hasarı Modeli

Sıvı bazlı modelde olduğu gibi bu modelde de öncelikle deney hayvanına kraniotomi yapılır. Elektromanyetik cihaz ya da piston yardımı ile kraniotomi defektinin olduğu yerdeki beyin zarı bölgesine direkt olarak travma oluşturulması esasına dayanarak yapılan bir modeldir. Gerçekleştirilen travma ile bölgesel kontüzyon ve kanamalar meydana getirilir(86,90).

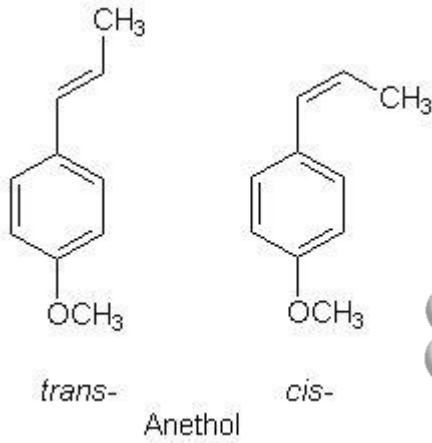
Penetran-Balistik Hasar Modeli

Bu modelde ateşli silahla meydana gelen yaralanmalarda ise ortaya çıkan hasar boyutunu göstermek amaçlanmaktadır. Bu modelde yüksek enerji ihtiva eden mermi çekirdeği kullanılarak travma oluşumu amaçlanmakta olup travma mermi çekirdeğinin giriş yeri, şiddeti ve beyin dokusu içinde katettiği mesafeye göre değişmektedir. Bu hasar modeli şeklinde bölgesel ya da yaygın beyin hasarı meydana gelebilmektedir(86,91).

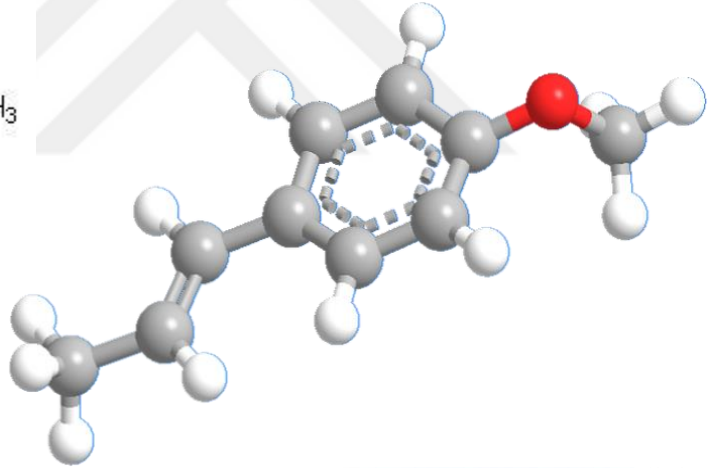
2.1.7- Anetol'ün Kimyasal Yapısı ve Genel Özellikleri

1-Anetol'ün Kimyasal Özellikleri

Anetol halkanın dışında çift bağ içeren hem cis hem de trans izomeri mevcuttur. Trans ve E izomeri en fazla bulunan ve en fazla kullanılan çeşitlerdir (şekil-1). Anetol'ün kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde verilmiştir(şekil-2).



Şekil 1. Anetol'ün izomerleri



Şekil 2: Anetol'ün yapısı

Anetol tatlı anason gibi bir tada sahip olup berrak bir yapıya sahiptir. Kehribar rengi bir sıvıdır. Anetol suda az çözünmesiyle bilinir fakat etanolde yüksek oranda çözünür. Kendiliğinden meydana gelen mikroemiyon özelliğinden dolayı anason aromalı likörler su ile seyreltildiğinde opak renk alırlar. Anetol şekerden 13 kat daha tatlıdır. Anetol'ün keskin bir kokusu mevcut olup özellikle

tuvalet sabunu, diş macunu, gargara gibi kötü kokuları önlemek gibi geniş bir alanda kullanılmaktadır. Anetol'ün %80'den fazla kullanım alanını temsil eder. Sakız, sigara, ünlü mamulleri gibi ürünlerde tatlandırıcı ve koku katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Anetol uçucu yağlarda daha sık oranda bulunur. Anetol; anason yağında, yıldız anason yağında, rezene yağında yüksek miktarda bulunur. Uçucu yağların bitkilerde koruma ve iletişim gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Bitkiyi virüs, bakteri, mantar gibi ajanlardan korur. Otçul hayvanların bitkiyi yemesine engel olmakla birlikte bitkilerin üremelerine de katkı sağlamaktadır. Anason uçucu yağlarının sekretolitik, antispazmodik, sekretomotor ve antimikrobial özelliklerinden dolayı tıbbi olarak kullanımı mevcuttur. Geleneksel olarak anason mide rahatsızlıklarında, burun akıntısı, balgam sökücü, idrar sökücü ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır. Kadınlarda menstürel ağrıların tedavisinde, erkeklerde “erkek menapozu” semptomlarını tedavi etmek için kullanıldığı bilinmektedir. Diğer kullanım alanları olarak uykusuzluk, kabızlık, nöbet, nikotin bağımlılığı astım sayılabilmektedir. Anason sedef gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde direkt olarak cilde uygulandığı da bilinmektedir. EMA Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi, deneyim ve uzun süreli kullanıma dayanarak anason ve anason yağı geleneksel kullanım endikasyonlarını şu şekilde sıralamaktadır: şişkinlik ve gaz dahil olmak üzere spasmodik gastrointestinal komplikasyonların semptomatik tedavisinde, soğuk algınlığı ile ilişkili öksürükte göğüs yumuşatma tedavisinde. Bu endikasyonlar; anasonun geleneksel kullanımına dayanmaktadır. Genel anlamda deneysel veriler ve uzman görüşleriyle desteklenmesine karşın klinik çalışma verileri mevcut değildir.

2-Anetolün Farmakokinetiği

Anetol oral yolla alındığında hızlı bir şekilde emilime uğrar ve karaciğerde tama yakını metabolize olarak konjuge metabolitler üretir. Böbrek yoluyla yüksek oranda ekskresyona uğrar fakat düşük miktarda solunum yoluyla karbondioksit aracılığıyla atılımı da söz konusudur.

3-Anetolün Farmakolojik Etkinlikleri

3.1- Antioksidan Aktivite

Rezene yağı, çift lipid model sistemi ile değerlendirilen antioksidan özellikleri gösterilmiştir. Modifiye edilmiş bir tiyobarbitürik asit reaktif tür deneyi ve bir misel sisteminde linoleik asitten hidroperoksidiyenlerin spektrofotometrik tespiti, referans antioksidanlar alfa-tokoferol ve bütillenmiş hidroksitoluen ile karşılaştırılabilir. Rezene tohumlarının su ve etanol özütleri, linoleik asit sisteminde peroksidasyonun %77,5 ve %99,1 oranında inhibisyonu gösterilmiş ve bu oran aynı dozdaki alfa-tokoferolden (%36,1) daha yüksektir(92).

3.2- Antimikrobiyal Aktivite

Anetol; çeşitli bakteri, virüs, mantar, mayalara karşı oldukça güçlü aktiviteleri olduğu çeşitli deneysel yöntemlerle kanıtlanmıştır. Yapılan deneylerde anetol bileşenlerinin anti-HSV-1 gibi etkinlik göstererek direkt olarak viral partiküllerin aktivitelerini engellediği ortaya konulmuştur. Yıldız anason yağının virüslerin meydana getirdiği enfeksiyonları ciddi oranlarda azalttığı deneylerle kanıtlanmıştır(93). Anasonun aseton bileşeni E.coli ve Staf.aureus gibi etkili bakterileri bile içine alan birçok bakterinin büyümesini direkt olarak engellediği ortaya konulmuş olup aynı zamanda Candida albicans gibi etkili mantar türlerine karşı da ciddi anti-fungal özellikleri olduğu da bilinmektedir(94). Anason yağı tek başına Salmonella enteritidis üzerine ciddi etkileri olduğu in-vitro olarak ortaya koyulmuştur. Anasonun esansiyel yağ bileşeni E.coli, Staf.aureus, C.albicans, S.typhimurium gibi mikrobiyal etkenlerin büyümelerini agar dilüsyon yöntemi ile engellediği gösterilmiştir(95). Anetol ayrıca sivrisineklere karşı önemli bir böcek koruyucu etki göstermektedir(96).

3.3- Spazmolitik Aktivite

Yapılan çalışmalarda anasonun uçucu yağ bileşenlerinin birtakım kasılmaya neden olan ajanlar tarafından kasılmış olan trakeal ya da ileal düz kaslar üzerinde önemli gevşetici etkileri olduğu ortaya koyulmuştur(97).

3.4-Gastroprotektif Aktivite

Anetol; etanol tarafından meydana getirilen ülserogeneze karşı önemli bir gastroprotektif etki göstermektedir. Bu antiülserik aktiviteyi antiplatelet ve vazorelaksan aktiviteyle mide mukozasına gelen kan miktarını arttırarak sağladığı da söylenebilir. Etanol tarafından meydana getirilen vasküler staz ve oksijensiz serbest radikaller mukoza yüzeyinde hasara rol açarak lokal vazokonjesyona neden olurlar(98). Yapılan deneylerde bu bölgelerin anetol ile maruziyeti sonrası etanol ile aktive olan ülser modelindeki mide mukozasında önemli miktarda mukus üretimi meydana gelmiştir(99). Anetol ağızdan 30, 100, 300mg/kg olarak verildiğinde etanol ve indometasinin meydana getirdiği ülserogeneze karşı gastroprotektif etki gösterdiği ortaya koyulmuştur. Rezene çözeltileri etanol ile gastrik hasar oluşturulmuş deney farelerinde etkinliği değerlendirilmiştir. Rezene 75, 150, 300mg/kg dozda ağızdan gavaj olarak verilmiş ve karşılaştırma için 20mg/kg dozdan famotidin verilmiş. Rezene ve famotidin etanolün meydana getirdiği gastrik mukoza hasarını önlediği bulunmuştur(100).

3.5-Sekretolitik Aktivite

Anestezi altındaki deney hayvanlarına %12 etanol 50mg/kg b.w. dozunda intragastrik olarak verilir. Daha sonra uygunlama sonrası ilk 2 saatte etanol içindeki uçucu yağ çözeltisi solunum yollarındaki salgılarda 3 ila 6 kat arasında artışa sebep olmuştur. Aynı şekilde hazırlanmış başka bir deneyde ise yağ 0,0015 ml/kg dozunda ağızdan verildiğinde ise solunum yolu salgılarında %28 oranında bir artışa neden olduğu görülmektedir. Kedilere intragastrik olarak 2 damla uygulanan uçucu yağ çözeltisi solunum yollarında mukus sekresyonlarını ciddi şekilde artırmıştır ve önceden afyon alkaloidlerinin inhibe ettiği mukus salgısının siliyer aktiviteyle uzaklaştırılmasını indüklemiştir(101). Yapılan bir başka deneyde kurbağa özefagusundan izole edilen silialarına 200µl anason infüzyonundan 90 saniye sonra mukosiliyer aktivite hızında %12 bir artış meydana gelmiştir(102).

3.6-Antinosiseptif ve Anti-inflamatuar Aktivite

İnflamasyonun neden olduğu ağrılarda anetolün etkinliği değerlendirilmiş ve asetik asidin intraperitoneal verilerek neden olduğu kıvrınma modelinde farmolinde indüklenen pençe tekmeleme modelinin ikinci aşamasında anetolün 62,5, 125, 250,

500mg/kg dozda uygulanmasında antinositif etki meydana geldiği gösterilmiştir. Anetolün ağrı üzerine olan etkisi enflamasyona neden olan mediyatörleri azaltmasına bağlı olabildiği söylenmektedir(103). Anetol ile 2 saat boyunca ön inkübasyona uğramış ML1a(Miyeloblastik Lösemi Hücreleri Hattı) hücrelerinin TNF ile devam eden tedaviye verdikleri yanıt azalmıştır(104). E.coli lipopolisakkarit ile aktive olan periodontitis fare modellerinde anetol ve ketoprofenin IL-1b ve TNF-alfa üzerindeki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Anetol 10mg/kg intraperitoneal veya ketoprofen 10mg/kg intraperitoneal uygulaması sonrası IL-1b ve TNF-alfa üretimi üzerinde benzer baskılamaya neden oldukları ortaya koyulmuştur(105).

Anetol ve estragol 10mg/kg dozda histaminin, bradikinin, sodyum nitroprussid, P maddesi, serotonin gibi karregan ile indüklenen ödeme neden olan modülatörler veya inflamatuvar araçlar tarafından meydana getirilen bir pati ödemi modelinde test edilmiştir. Histamini anetol %70 oranında inhibe ederken estragol %2 oranında, bradikinin anetol %41 estragol %42 oranında, P maddesi anetol %65 estragol %67 oranında, TNF-alfa anetol %41 estragol %42 oranında birbirlerine benzer ve yakın oranlarda inhibe etmişlerdir. Bunların serotonin ile indüklenen ödemde etkileri anetol %55 ve estragol %30 inhibisyon ile farklı etki göstermişlerdir. Sodyum nitroprussid inhibisyonuna estragol %22 etki göstermiş iken anetol etki göstermemiştir(106).

Kroton yağı ile meydana getirilen kulak ödemi ve karregan ile meydana getirilen plörezi gibi akut inflamasyon durumlarında anetolün etkinliği değerlendirilmiştir. Anetolün 250 ve 500mg/kg dozdan oral gavaj olarak verilmesi hem plevral eksüdatif sıvı hacmini azaltmış hem de bu bölgeye gelen lökositlerin sayısından azalmaya sebep olmuştur. İnflamatuvar eksüdatif sıvıdaki nitrik oksit ve prostoglandin E2 seviyelerinde azalma olduğu dikkat çekmiştir fakat bununla birlikte TNF-alfa ve IL-1b miktarlarında önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Anetolün oral uygulanımı sonrası kulak ödeminde ise eksüdatif sıvı artışında önemli bir azalma meydana gelmiş ve bununla birlikte miyeloperoksidaz aktivitesinden önemli bir inhibisyon meydana gelmiştir. Yapılan bu araştırma baz alındığında anetolün prostoglandin E2 ve nitrik oksit üzerindeki inhibisyon etkisi ile bazı akut inflamasyon ile ilişkili hastalıklarda etkili olabileceği gösterilmiştir(107).

4-Anetolün Güvenliği ve Toksisitesi

Anetol, karaciğer kanserinde hafif bir artış meydana getirdiği fakat kanıtların yetersiz olması nedeniyle anetolün kanser ile ilişkili olmadığı kabul edilir. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) tarafından yapılan değerlendirmelerde anetolün motor aktivitede azalma, analjezik, hipnotik, vücut ısısında düşme, antikonvülzan etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu değerlendirmede anetolün mevcut kullanımında mevcut seviyelerde güvenli olduğu söylenmektedir. Büyük miktarlarda hafif toksik etki göstermektedir. Avrupa konseyi(1970) anetol için 1,5mg/kg günlük kullanım dozunu kabul edilebilir seviye olarak belirtmiştir. 90 günlük süre boyunca farelere 240mg/kg/gün olarak trans-anetol verilmiştir. 120mg/kg/gün ve üzerindeki dozlarda ciddi şekilde dehidratasyon ve kilo kaybı dikkat çekmiş fakat bu da diyetin zayıf lezzetine ve yeniden azaltılmış gıda alımına bağlanmıştır. 30mg/kg/gün ve üzerindeki dozlarda oral olarak beslenen deney farelerinde karaciğer ağırlığında artış, karaciğer glikojeninde azalma, kısmen troid dokusunda artış saptanmıştır. Anetolün sitokrom p450 ve p448 gibi karaciğer enzimleri üzerine hafif indükleyici etkisi olduğu söylenmektedir hatta bu karaciğer üzerindeki artışın bu enzim indüksiyonuna adaptasyon için fizyolojik bir hareket olduğu söylenmektedir(108). Anetolün aşırı dozu olarak insanlarda 1 ila 5ml anason yağının alınması bulantı, kusma, nöbet ve akciğer ödemi ile ilişkilendirilmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

1-Deney Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışma için gerekli izin ve onaylar alındıktan sonra DÜSAM biriminden 28-30gr ağırlığındaki yetişkin erkek farelerden 35 adet temin edildi. Bu 35 hayvan 5 gruba eşit sayıda olacak şekilde ayrıldı. 1 hafta boyunca aynı koşullar sağlanarak grup adaptasyonları sağlandı.

Tablo 2: Deney grupları

Deney ve Kontrol Grupları	Hayvan Sayısı
Kontrol Grubu	7
Travmatik Beyin Hasarı (TBH) Grubu	7
TBH + 40 mg/kg Anetol Grubu	7
TBH + 80 mg/kg Anetol Grubu	7
TBH + 160 mg/kg Anetol Grubu	7

Bu gruplar (tablo-2) oluşturulduktan sonra kontrol grubundaki hayvanlara 72 saat boyunca herhangi bir uygulamada bulunulmadı. Travma grubundaki hayvanlara ağırlık düşürme yöntemi ile travma uygulandı ve daha sonra herhangi bir uygulamaya tabi tutulmadan sadece analjezi uygulanarak optimal koşullarda takibi yapılarak deney sonunda sakrifikasyon sonrası dekapitasyon yapıldı. Travma sonrası doz bağımlı gruplar ise travma uygulandıktan 3 saat sonra ve takip eden 72 saat boyunca aynı gün ve saatte bir grup için 40mg/kg anetol diğer grup için 80mg/kg anetol ve son grup için ise 160mg/kg anetol uygulandı.

2-Deneyin Yapılış Aşamaları

Yapılan deneyimizde kontrol grubu hayvanlarına herhangi bir işlemde bulunulmadı. Deney sonunda ise sakrifikasyon işlemi sonrası dekapitasyon yapılarak beyin dokuları alındı. Geriye kalan gruplara XS Zhang ve arkadaşları tarafından

gerçekleştirilen ağırlık düşürme modeli ile travmatik beyin hasarı meydana getirildi(109). Travmatik beyin hasarı metodunda öncelikle hayvanlar ksilazin ve ketamin yardımı ile genel anestezi uygulandı. Serbest ağırlık düşürme yöntemi ile orta düzey travmatik beyin hasarı oluşturuldu. Anetol grupları için; anetol alkolde serbest halde çözüldüğü için ayarlanacak her üç doz 0,1 ml saf etanol içerisinde çözünüp 5 kat izotonik ile sulandırıldı. Deney grubundaki hayvanlara uygulanacak dozlar saf alkolde çözünüp alkol oranları izotonik ile 3,1'e düşürülerek 0,6 ml'lik çözelti şeklinde oral gavaj olarak travmatik beyin hasarlı anetol grupları için hazırlandı. Travmatik beyin hasarlı anetol gruplarında ilk gruba 3.saatte ve takip eden 3 gün boyunca 40mg/kg anetol, diğer gruba 80mg/kg anetol son gruba ise 160mg/kg anetol aynı gün ve saate günlük tek doz olarak verildi. Deney süresi boyunca travma uygulanan tüm hayvanlara aneljezi amaçlı 5mg/kg dozdan meloksikam uygulandı. Tüm deney hayvanlarına son tedavi dozları uygulandıktan 1 saat sonra kalpten kan alınarak sakrifiye edildi. Total beyin dokuları alınıp hemisferlerin yarısı ışık mikroskobik inceleme için %10'luk formole diğer yarısı ise biyokimyasal inceleme ve ELISA analizleri için -80 derecede muhafaza edildi.



Resim 1: Travmatik beyin hasarı uygulanacak düzenek



Resim 2: Genel anestezi altındaki deney hayvanı



Resim 3: Travma oluşumu hemen sonrası



Resim 4: Travma uygulanmış hayvanın eksize beyin dokusu

3-Alınan Dokuların Takip ve Boyama Aşamaları

Deney hayvanlarından alınan beyin dokuları bir gün boyunca fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Sonrasında su altında 12 saat boyunca yıkandı. Dehidrasyon amacıyla sıralı artan şekilde hazırlanan alkollerde birer saat boyunca bekletildi. Dokular bu işlemlerden sonra eşit oranda ksilen ve parafin karışımında 2 saat bekletilmek suretiyle parafin infiltrasyonu yapıldı. Daha sonra bu parafinin yerine temiz parafin koyularak bu işleme 1 saat daha devam edildi. Doku örnekleri daha sonra parafin bloklara yerleştirildi. Mikrotom yardımı ile meydana gelen bu parafin bloklar 5µm kalınlığında seriler elde edildi. Daha sonra bu seriler 56 °C inkübatör içinde parafin depolimerizasyon ve kurutma işlemine 30 dakika boyunca tabi tutuldu. Ardından boyama işlemine geçildi. Histokimyasal analizler için H&E ile boyandı. Geriye kalan diğer kesitlerde ise TNF-alfa, bax, kaspaz-3 bakmak için immunohistokimya yapıldı. MDA örnekleri için deney aşamasında alınan biyopsi örnekleri kullanıldı.

3.1- Hematoksilen ve Eozin Boyama

Alınan örneklerden parafini uzaklaştırmak için 10 dakika boyunca iki seri ksilen içerisinde bekletilme işlemi yapıldı. Rehidratasyon işlemi için seri bir şekilde artan alkollerin içerisinde 15 dakika süreyle sırasıyla bekletildikten sonra distile suya bırakıldı. Alınan örnekler ilk olarak hematoksilen içeren solüsyonun içine bırakıldı ve 8 dakika boyunca bu solüsyon içerisinde oda ısısında boyanmaya bırakıldı. Daha sonra yıkanmaya alınan kesitler eozin ile boyanmak için eozin solüsyonu içeren kaba yerleştirildi. Bu alkol içeren eozin solüsyonuna bırakılan örnekler 3 dakika boyunca eozin ile boyanmaya bırakıldı. Eozin boyasının fazlasını uzaklaştırabilmek için örnekler %70 ve %80'lik alkollere sırasıyla batırılıp çıkarıldılar. Daha sonra geriye kalan alkol serilerinde 1 dakika boyunca sırasıyla bekletildiler. Son olarak iki seri ksilen ile şeffaflandırılarak entellan ile kapatıldı. Tüm bu işlemlerden hazırlanan dokular daha sonra mikroskopik incelemeye alınmak amacıyla koruma altına alındılar.

3.2- İmmunohistokimyasal Boyama

Daha önceden hazırlanan kesitlerden immunohistokimyasal analiz için ayrılan örneklerle TNF-alfa, bax, kaspaz-3 yapıldı. Bu dokular içinde aynı şekilde parafin uzaklaştırma işlemi yapıldı. Rehidratasyon amacıyla azalan alkol serilerinde sırasıyla 5 dakika boyunca kesitler bekletildi. Daha sonra distile suya bırakıldı. Buradan alınan örneklerle immunohistokimyasal analize geçildi.

İlk olarak iki seri tamponlanmış fosfat tamponlu salin solüsyon içinde 5 dakika boyunca yıkanmaya bırakıldı. Antijen retrieval aşaması için sodyum sitrat solüsyonu içinde ısıtılma işlemine tabi tutuldular. Isıtılma işlemi sonrasında soğutulmak için oda ısısına alındı. Ardından iki seri fosfat tamponlu salin solüsyon içinde yeniden yıkanmaya alındı. Daha sonra metanolde çözünmüş %3'lük H₂O₂ solusyonuna alınarak 20 dakika boyunca bu solüsyonda bekletildi. Bu bekletilmedeki amaç endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmaktır. Kesitlerin kurumaması için hidrofobik PAP pen ile etrafları çizildi. Alınan bu örneklerin üzerine bloklama solüsyonu solüsyonu(Katalog no: TA-125-UB, Thermo Scientific, Waltham, MA, A.B.D.) damlatıldı. İnkübasyon amacıyla oda sıcaklığında 7 dakika boyunca bu şekilde bekletildi. Daha sonra kesitler üzerine TNF-alfa(Katalog no: sc-52746, Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, TX, ABD), bax(Katalog no: sc-7480, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD) kaspaz-3(Katalog no: sc-56053, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ABD) damlatıldı. Daha sonra bu örnekler 4 °C’de nemli bir ortam kabının içinde tüm gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikör damlatılma işlemine geçildi. Sekonder antikör(Katalog no: TP-125-BN - Thermo Scientific, Waltham, MA, A.B.D.) damlatılma işlemiden sonra inkübasyon amacıyla bu sefer oda sıcaklığında 20 dakikalık süre bekletme işlemine tabi tutuldu. Her damlatılma öncesi olduğu gibi yeniden iki seri fosfat tamponlu salin solüsyonda yıkama işleminden sonra peroksidaz enzimi(Katalog no: TS-125-HR - Thermo Scientific, Waltham, MA, A.B.D.) damlatıldı. Sekonder antikorda aşamasıyla aynı şekilde inkübasyona tabi tutuldu. 3,3'-Diaminobenzidin(DAB) kullanılarak immunopozitivite meydana getirildi. Hazır halde bulunan bir kit (Katalog no: TA-125-HD - Thermo Scientific, Waltham, MA, A.B.D.) bunun için kullanıldı. Reaksiyon olması gözlenmeye başlandı. Reaksiyon meydana geldiği zaman fosfat tamponlu salin solüsyonda yıkanma sonrası hematoksilin solüsyonu ile zıt boyandı. Daha sonra yıkamaya alınan kesitler artan alkol serilerinde bekletilerek şeffaflandırılma işlemi gerçekleştirildi. Entellan ile kapatıldı ve inceleme için koruma altına alındı.

3.3- İmmunohistokimyasal Kantitatif Değerlendirme

İmmunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerin DAB immunopozitivite düzeyi zıt boyanan hematoksilin ile boyanan kesitlerle karşılaştırma işlemi yapıldı ve sonuç olarak seki-kantitatif verilere ulaşıldı. Kesitlerde travma grubuna ait hayvanların beyin korteksi kesitleri ile kontrol grubundaki hayvanların beyin korteksi bölgesinin boyanma yoğunluğu inceleme kullanıldı. Bu değerlendirme için hematoksilin boyası içerisindeki DAB pozitif alanların yoğunluğu hesaplanarak yapıldı. Image J Versiyon 1.53n yazılımı kullanılarak bu hesaplama yapıldı. Bu oranlar istatistiksel analiz için kullanıldı.

3.4- İstatistiksel Analiz

Meydana gelen veriler ışığında gruplar arasında herhangi bir farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi. Bu amaçla meydana gelen Image J analiz sonuçları SPSS (IBM) programında istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak parametrik olmayan Kruskal Wallis testine tabii tutuldu ve

gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma Tamhane T2 testi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkın $p < 0.05$ olması durumunda gruplar fark bu şekilde anlamlı kabul edildi. Elde edilen istatistiksel sonuçlar ortalama $\pm$ SD (standart sapma) şeklinde gösterildi.

3.5- Malondialdehid(MDA) Tayini Analizi

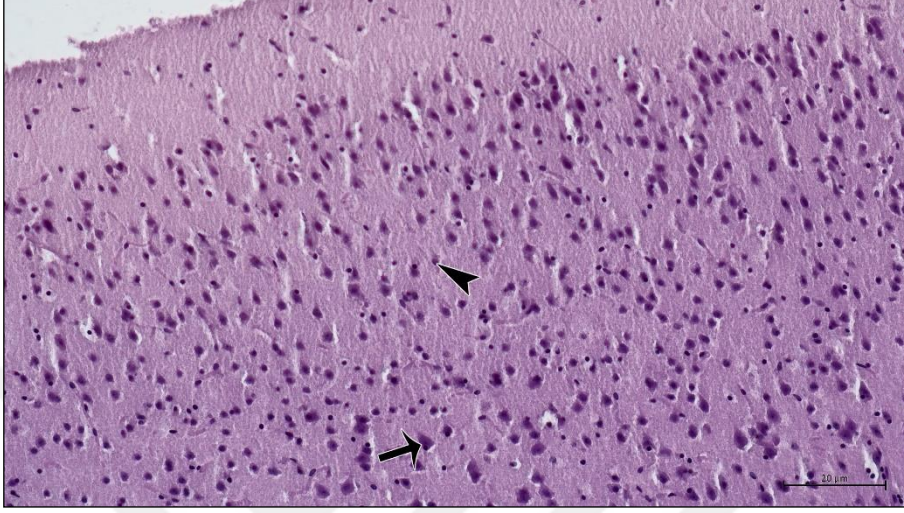
Deneyisel çalışma sırasında alınan beyin biyopsi örneklerinden Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu kullanılarak gerçekleştirildi. 21 Tiyobarbütirik asit ile 90 - 95 C°'de reaksiyona giren malondialdehid pembe renkli bir kromojen meydana getirmektedir. Onbeş dakika sonra numuneler hızla soğutuldu ve absorbensları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen değerler nmol/g protein cinsinden ortaya konuldu.

3.6- İmmunohistokimya ve İstatistiksel Analiz

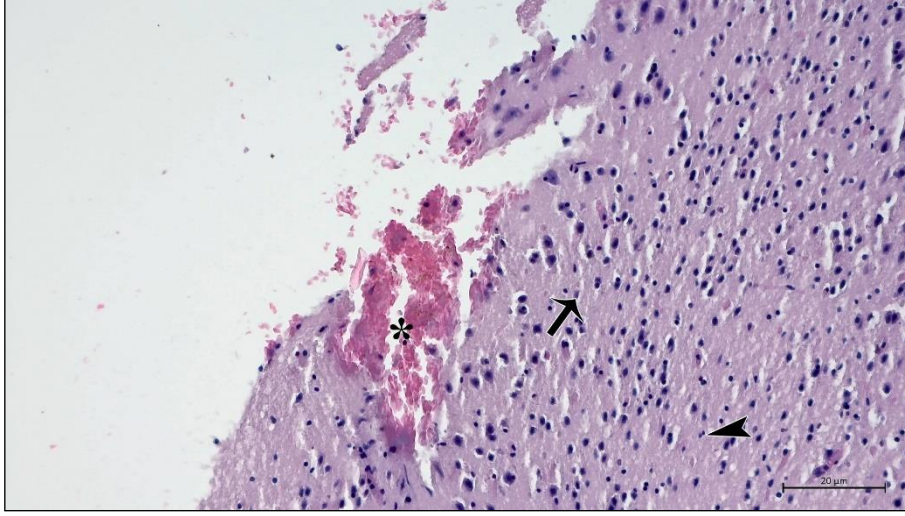
Bu şekilde boyanan kesitlerde DAB immunopozitivite değeri tüm doku bir bütün olarak ele alınarak değerlendirildi. travmatik bölgelerden rastgele seçilen alanlardan immunopozitiflik araştırıldı. İmage J yazılımı yine bu analiz için kullanıldı. Elde edilen veriler aynı zamanda istatistiksel olarak da kullanıldı bu amaçla non-parametrik olarak Kruskal Wallis testi kullanıldı. Bundan farklı olarak gruplar arasındaki multifaktoriyel karşılatırmalar için Tamhane T2 testinden yararlanıldı. Sonuçlar < 0.05 olması durumunda ($p < 0.05$) gruplar arasındaki fark bu şekilde anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

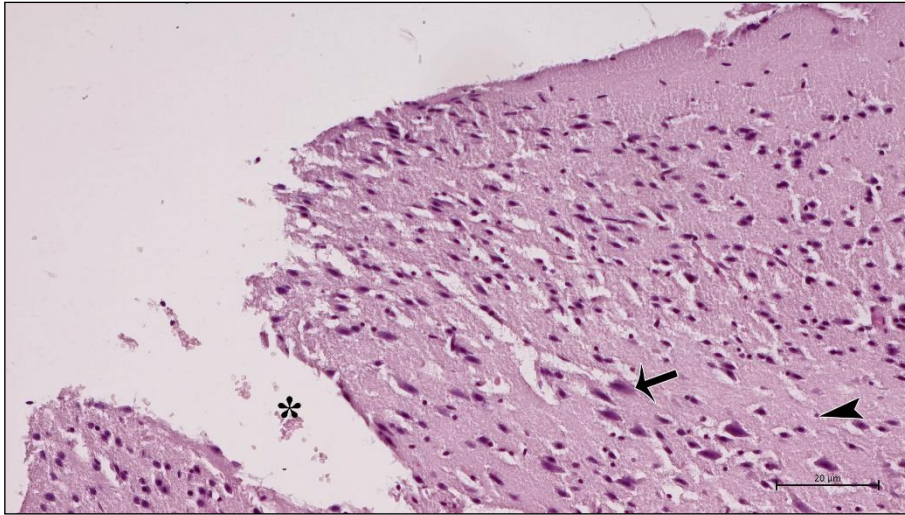
Hematoksilen ve Eozin Bulguları



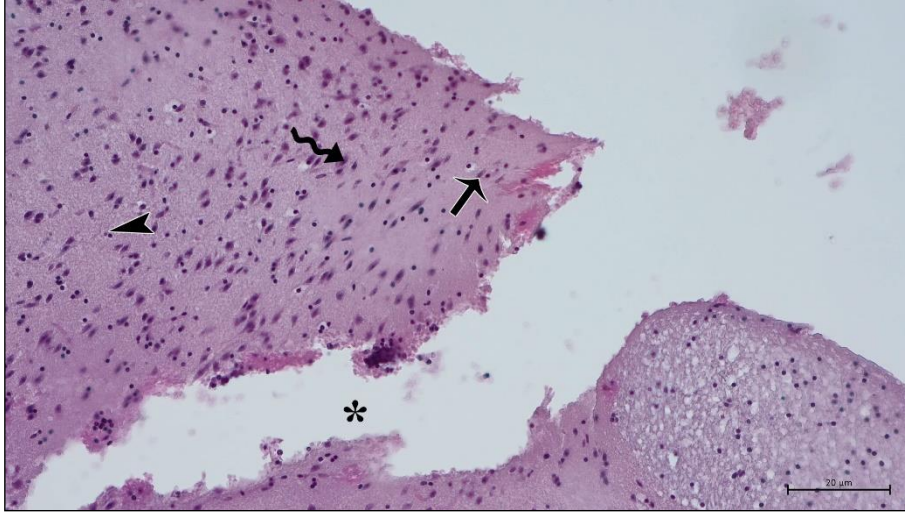
Resim 5: Kontrol grubuna ait beyin kesitleri. Kontrol grubunda beyin dokusunun normal yapıda olduğu, dokunun meningesler ile örtülü olup yapısında bol miktarda nöron ve glia hücre gövdesi barındırdığı, dokunun tamamen sinir liflerinden oluştuğu görüldü. Ayrıca bu gruptan alınan beyin örneklerinin yapısını oluşturan nöron hücre gövdeleri (**ok**) ve glia hücre gövdelerinin (**ok başı**) normal morfolojik yapıda oldukları, hem glial hemde nörol hücrelerin birbirinden farklı boyut ve şekillerde geniş bir yayılım gösterdiği görüldü. **Boyama:** Hematoksilen ve eozin, **Bar:** 20 µm.



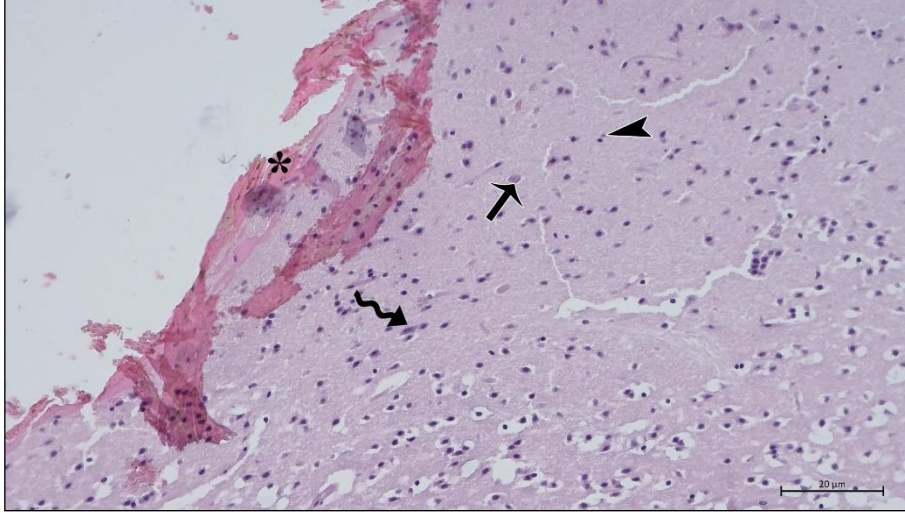
Resim 6: Travma grubuna ait beyin kesitleri. Travma uygulanan grupta frontal kortekste yaralanma bölgelerinde yoğun hemoraji (*), ayrıca subtravmatik bölgelerde vasküler yapılar da konjesyon ve hemorajik görüntü izlendi. Bu gruptaki beyin örneklerinde nöron hücre gövdelerinde (ok) piknotik çekirdek görüntüsü, karyolizis ve yer yer perinöral kavitede artış ve travmaya bağlı ödem alanları izlendi. Bu grubun beyin kesitlerinde nöroglia hücrelerinde (ok başı) karyolizis ve piknotik çekirdekten görünümü oldukça yaygındı. **Boyama:** Hematoksilen ve eozin, **Bar:** 20 µm.



Resim 7: Travma + 40 mg/kg grubuna ait beyin kesitleri. Travma ve 40 mg/kg tedavi uygulanan grupta serebral korteks hasarına bağlı hemoraji ve ödemli doku görüntüsü ve doku kaybındaki mevcut durum (*) beklenen düzeydeydi. Nöron hücre gövdelerinde izlenen piknotik çekirdek görüntüsünün yanı sıra hücre morfolojilerinin genel olarak irregüle olduğu izlenmekteydi (ok), yine nöroglia hücrelerinde piknotik çekirdek görüntüsü (ok başı) apoptotik hücre ölmünün önemli bir işareti olarak izlendi. Genel doku morfolojisi ve selüler morfoloji Travma grubu ile benzerdi. **Boyama:** Hematoksilen ve eozin, **Bar:** 20 µm.



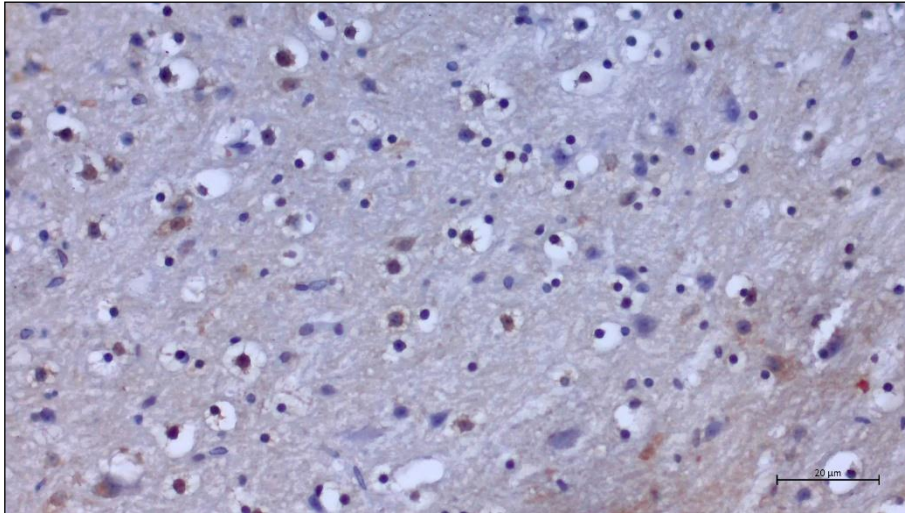
Resim 8: Travma + 80 mg/kg grubuna ait beyin kesitleri. Bu grubun beyin kesitlerinde travma şekillenen serebral kortekste diğer deney gruplarında olduğu gibi doku kaybı alanları, bu bölgelerde yoğun ödem görüntüsü ve travmatik hasar beklenen şekilde görüldü (*) 80 mg/kg tedavi uygulanan grubun nöronlarında (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) çekirdek yıkımı ve piknozis görüntüsü yoğun bir şekilde izlendi. Ancak bu grubun özellikle peritravmatik beyin dokusu piramidal nöronlarında (kıvrımlı ok) piramit üçgen görüntüsünün oldukça güçlü şekilde korunduğu ve travmaya eşlik eden oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik indüksiyon gibi etmenlerden düşük düzeyde etkilendiği ve sağlıklı nöron görüntüsü oluşturduğu görüldü. Bu grubun travma alanına yakın dokuda ve uzak alanlarda genel morfolojinin travma ve 40 mg/kg tedavi uygulanan gruplardan daha iyi olduğu tespit edildi. **Boyama:** Hematoksilen ve eozin, **Bar:** 20 μm.



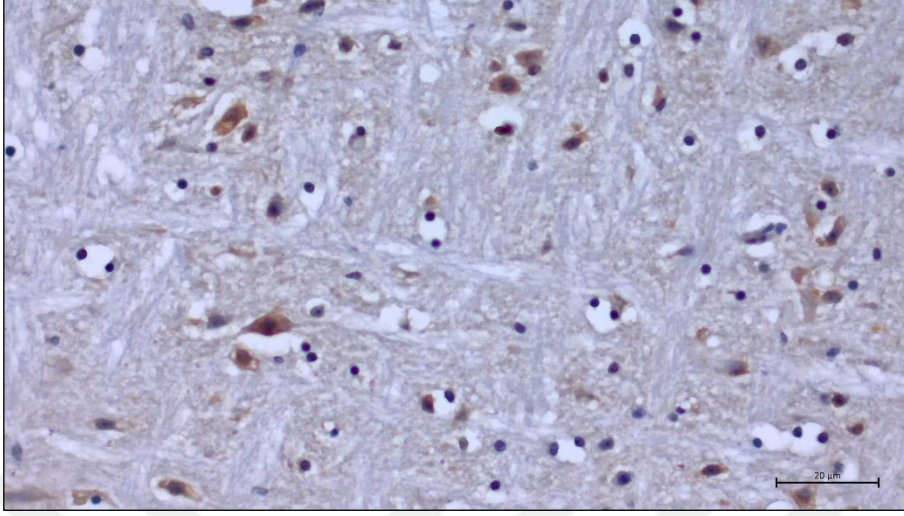
Resim 9: Travma + 160 mg/kg grubuna ait beyin kesitleri. Serberal korteksin travma modeli uygulanan bölgelerinde hemorajinin yanı sıra kan dokusunun parankimya geçtiği ve yoğun ödem olduğu (*) izlendi. Kortikal nöronlarda piknotik çekirdek ve karyolizise uğramış nöronlar izlenmekteydi (ok) ayrıca yine glia hücrelerinde yoğun hücre dejenerasyonu görüldü (ok başı). Buna karşın bu tedavi dozunun uygulandığı hayvanlara ait beyin kesitlerinde normal morfolojik yapıya sahip nöron (kıvrımlı ok) ve glia hücrelerin miktarında artış olduğu gözlemlendi. Bu grubun beyin dokusu görüntüsü ve hücre morfolojik yapı diğer deney gruplarıyla karşılaştırıldığında kontrol grubuna daha yakın bir görüntüdeydi. **Boyama:** Hematoksilen ve eozin, **Bar:** 20 µm.

İmmunohistokimya Bulguları

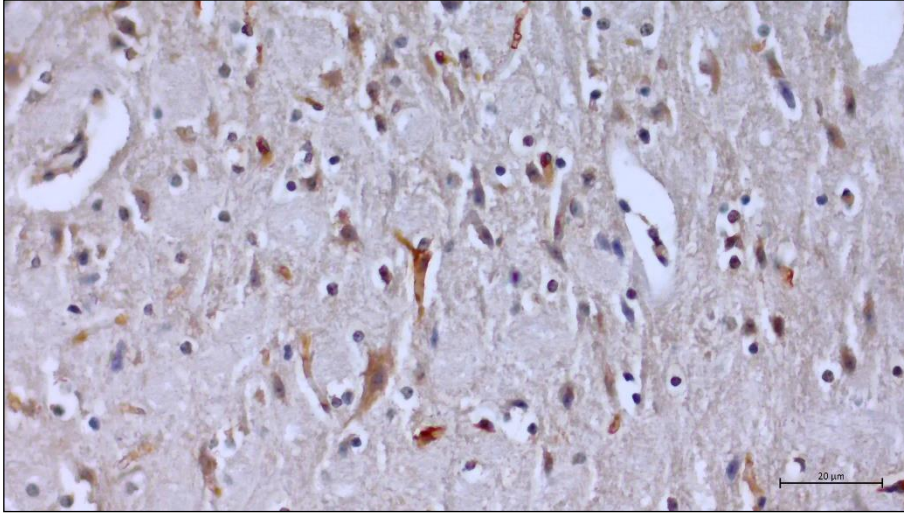
Bax İmmunohistokimya Bulguları



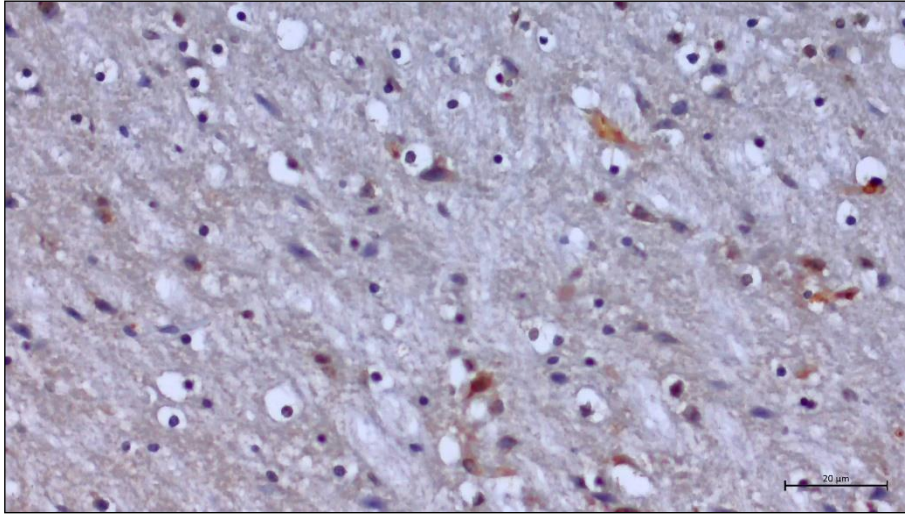
Resim 10: Kontrol grubu Bax İmmunohistokimya. Kontrol grubunda Bax immunopozitivitesi normal düzeyde izlendi. Hem nöronlarda, hem glia hücrelerinde sitoplazmik alanlarda Bax pozitiflik görüldü. **Boyama:** Bax immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm



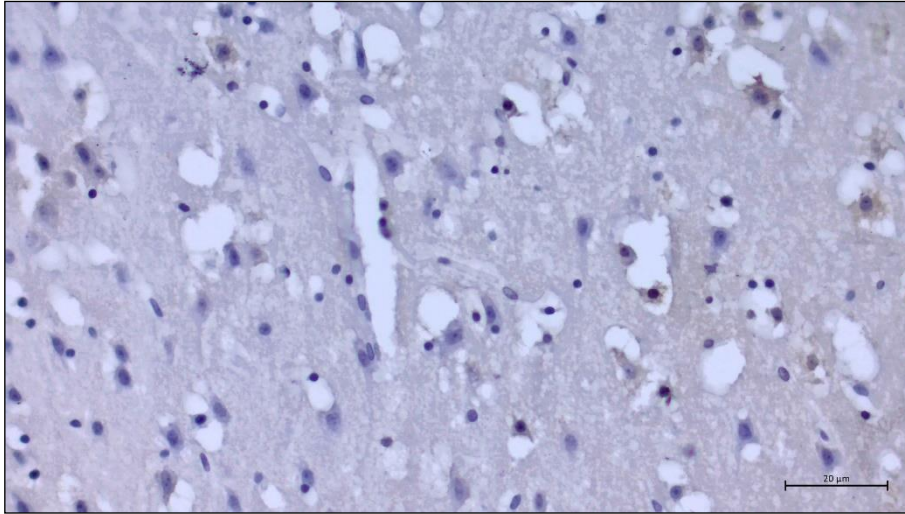
Resim 11: Travma grubu Bax İmmunohistokimya. Travma grubu beyin kesitlerinde hem nöron hemde nöroglialarda Bax immunpozitivitesinin artış gösterdiği izlendi. Dokunun genelinde immunointensite kontrol grubundan yüksek düzeyde görüldü. **Boyama:** Bax immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.



Resim 12: Travma + 40 mg/kg grubu Bax İmmunohistokimya. 40 mg/kg tedavi uygulanan hayvanların beyin dokusunda Bax dağılımı ve intensitesi Travma grubuna benzer şekilde görüldü. **Boyama:** Bax immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.

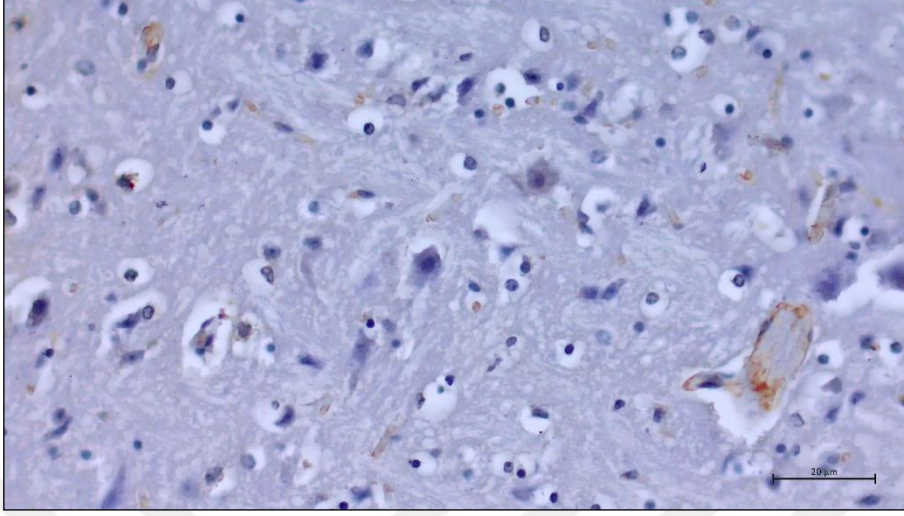


Resim 13: Travma + 80 mg/kg grubu Bax İmmunohistokimya. Travma + 80 mg/kg grubu beyin kesitlerinde Bax immunopozitivitesinin Travma ve Travma + 40 mg/kg gruplarından daha düşük düzeyde olduğu ancak bazı nöron ve nöroglialarda yoğun immunointensitenin varlığını sürdürdüğü tespit edildi. **Boyama:** Bax immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.

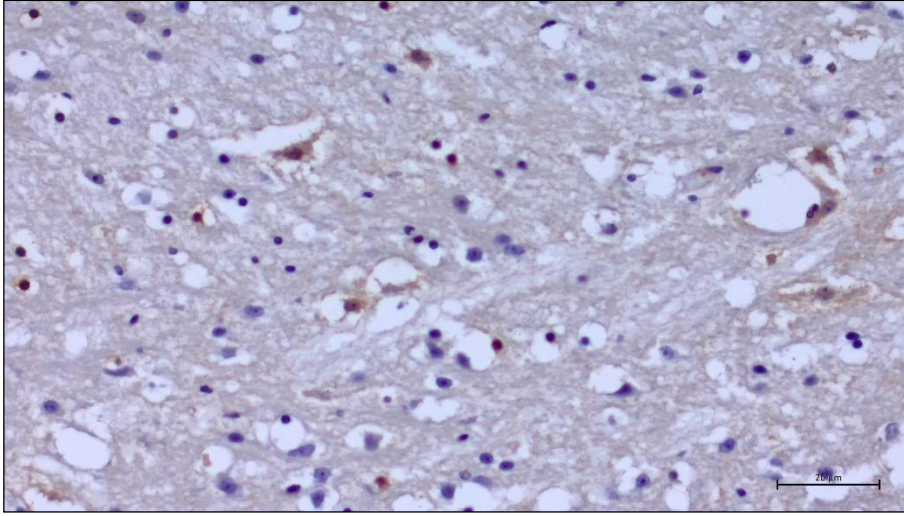


Resim 14: Travma + 160 mg/kg grubu Bax İmmunohistokimya. 160 mg/kg tedavi uygulanan hayvanların subtravmatik alanlarda yer alan nöron ve glia hücrelerinde Bax immunopozitivitesi anlamlı bir azalma gösterdi. Sitoplazmalarda bulunan immunopozitiflik kontrol grubuna benzer, yer yer daha düşük düzeylerdeydi. **Boyama:** Bax immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.

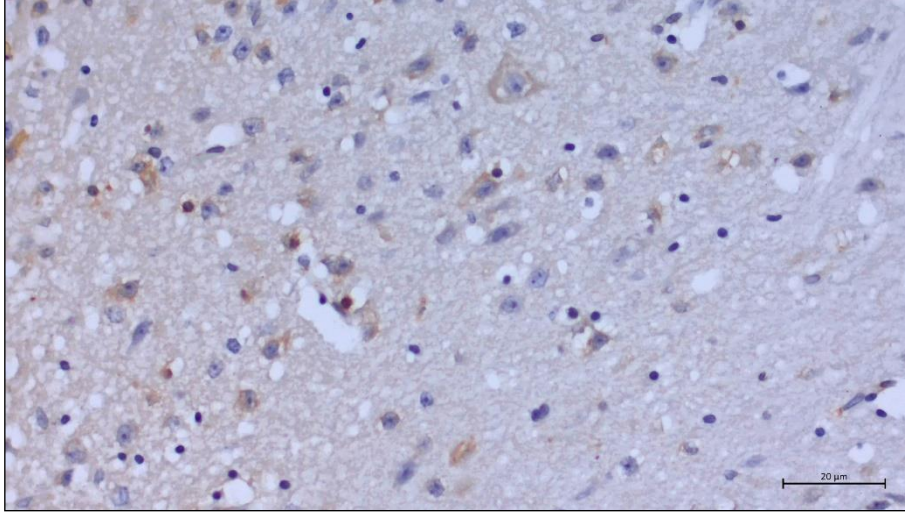
Caspase 3 İmmunohistokimya Bulguları



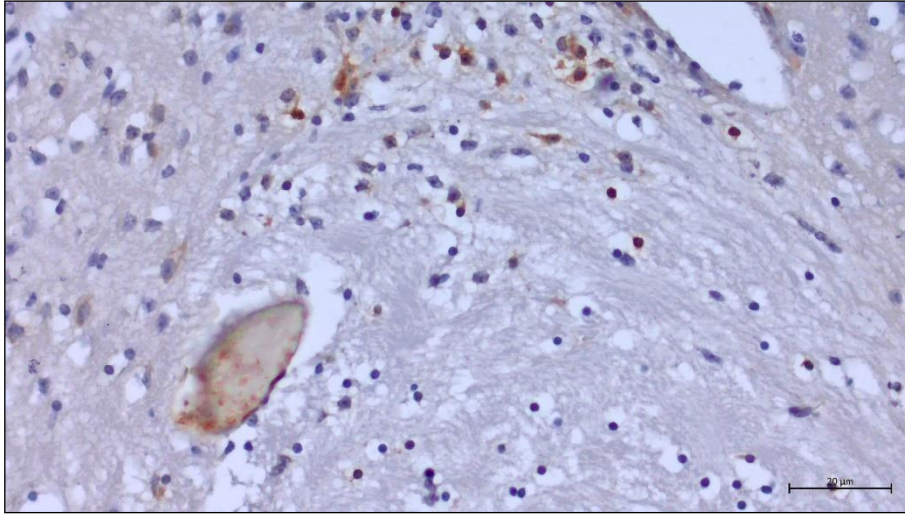
Resim 15: Kontrol grubu Caspase 3 İmmunohistokimya. Kontrol grubu beyin kesitlerinde Caspase 3 düzeyinin her iki merkezi sinir sistem hücre grubunda da oldukça düşük düzeyde olduğu görüldü. **Boyama:** Caspase 3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.



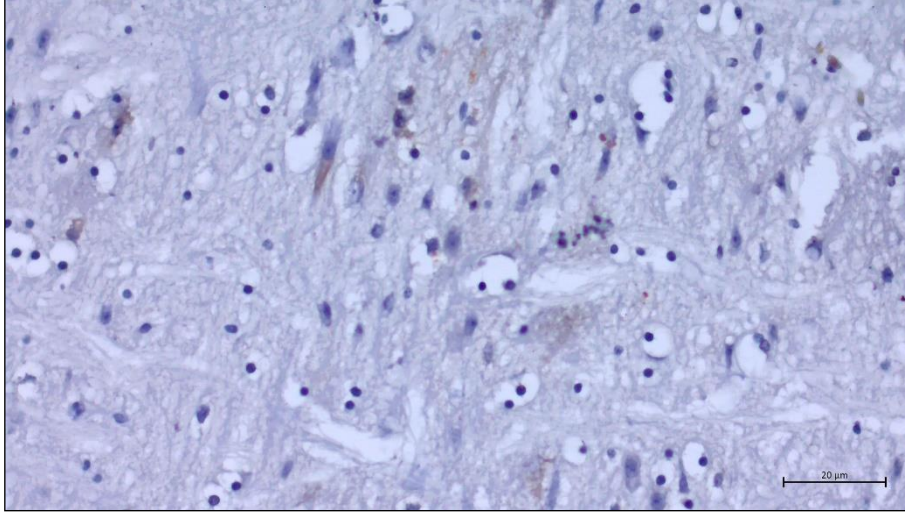
Resim 16: Travma grubu Caspase 3 İmmunohistokimya. Travma grubunda Caspase 3 immunpozitivitesinin nöronlarda ve glia hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede artış gösterme eğiliminde olduğu tespit edildi. **Boyama:** Caspase 3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.



Resim 17: Travma + 40 mg/kg grubu Caspase 3 İmmunohistokimya. Bu grubun beyin kesitlerinde nöron ve glial hücrelerdeki Caspase 3 immunointensite görüntüsü Travma grubuna benzer düzeydeydi. **Boyama:** Caspase 3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.

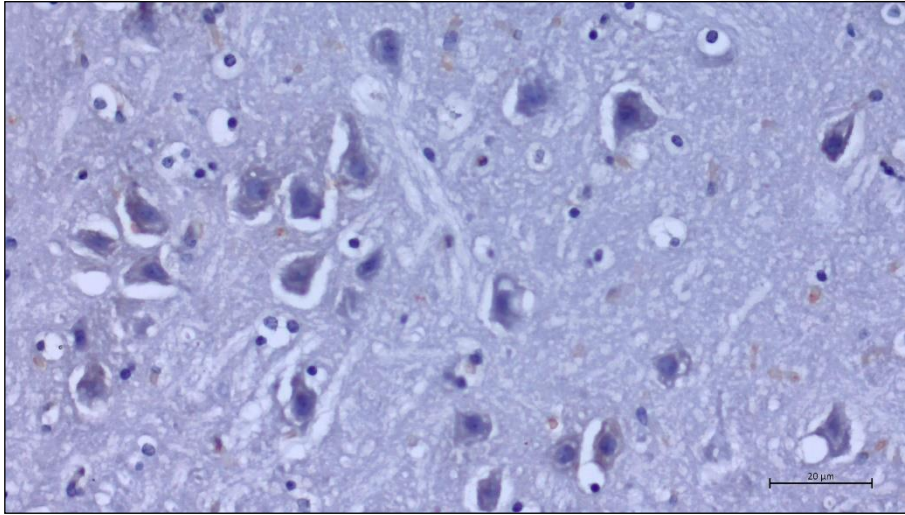


Resim 18: Travma + 80 mg/kg grubu Caspase 3 İmmunohistokimya. Travma + 80 mg/kg tedavi uygulanan hayvanların serebral nöronlarında ve glia hücrelerinde immunointensite yoğun izlendiği hücrelerde gözle görülür azalma olduğu ve bu grubun kesitlerinde kısıtlı bir apoptozis baskılanması olduğu tespit edildi. **Boyama:** Caspase 3 immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20µm.

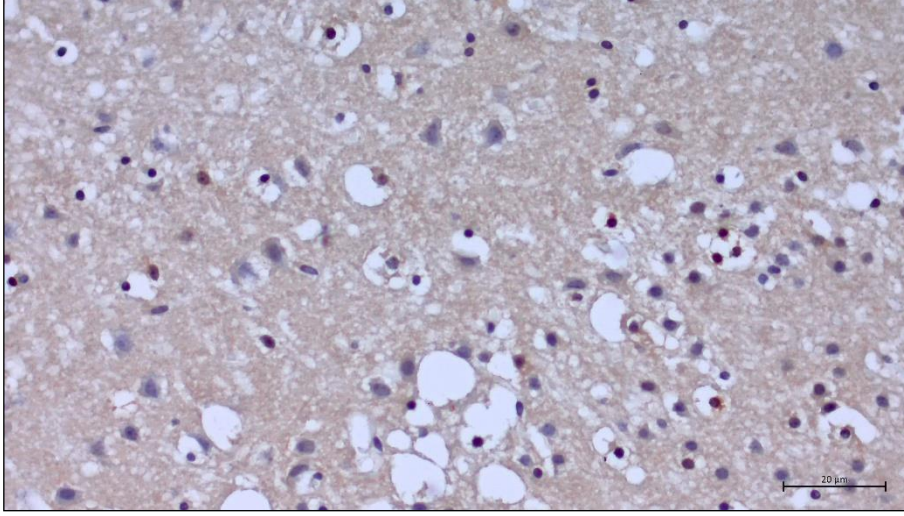


Resim 19: Travma + 160 mg/kg grubu Caspase 3 İmmunohistokimya. En yüksek doz tedavi uygulanan Travma + 160 mg/kg grubundaki hayvanların nöron ve glial hücrelerinde Caspase 3 immünointensite düzeyi diğer gruplardan oldukça düşük izlendi ve genel pozitiflik görünümü kontrol grubuna benzerdi. **Boyama:** Caspase 3 immünohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20 µm.

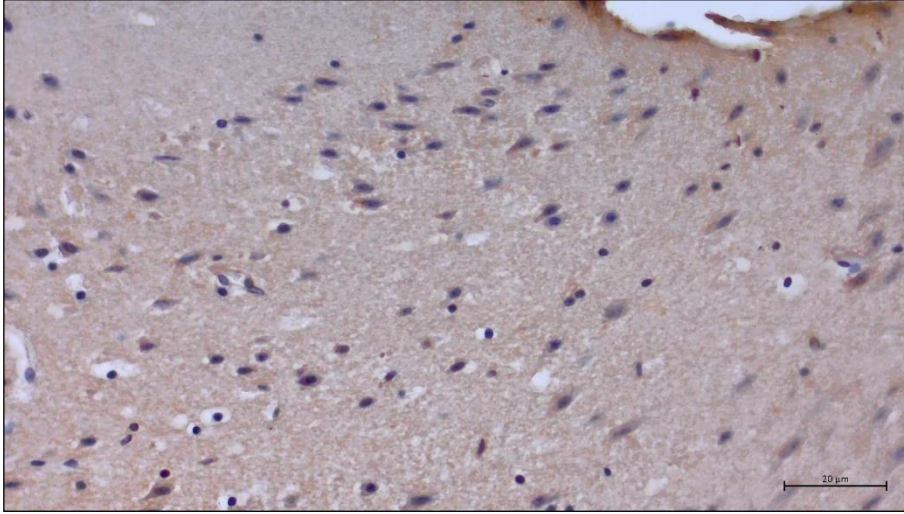
TNF – α İmmunohistokimya Bulguları



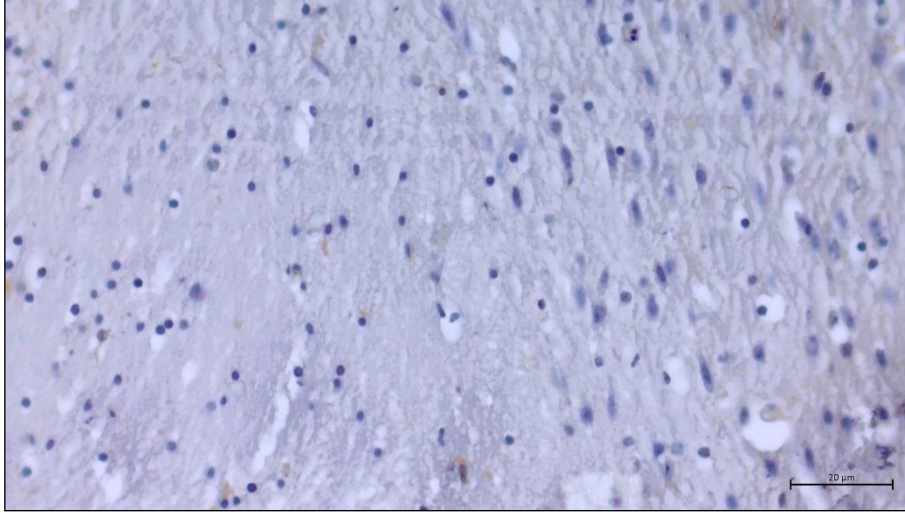
Resim 20: Kontrol grubu TNF – α İmmunohistokimya. Kontrol grubu beyin kesitlerinde TNF- α pozitivitesinin oldukça düşük olduğu görüldü. **Boyama:** TNF- α immünohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20 µm.



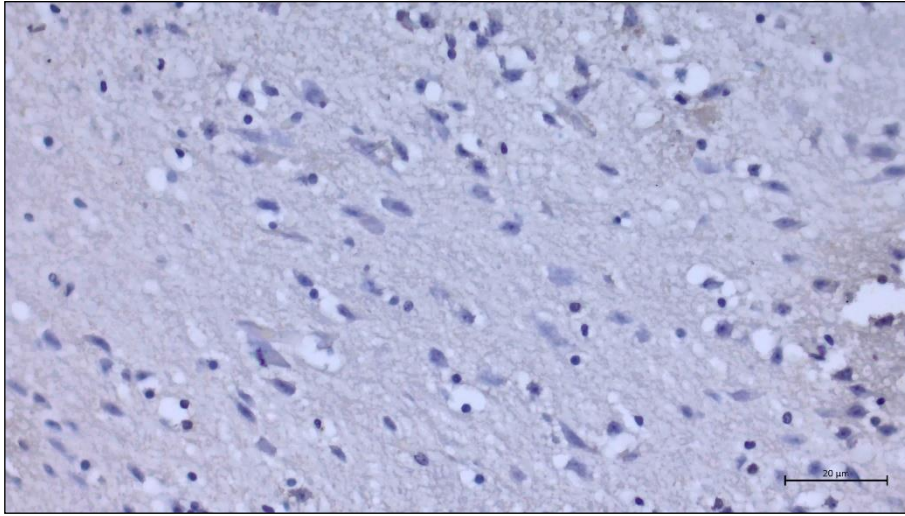
Resim 21: Travma grubu TNF – α İmmunohistokimya. Travma grubu beyin kesitinde immunointensitenin gözle görülür şekilde artış gösterdiği, glial hücrelerde yer yer mikrogial hücre sitoplazmalarına yoğun ekspresyonun varlığı görüldü. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20 μ m.



Resim 22: Travma + 40 mg/kg grubu TNF – α İmmunohistokimya. Travma + 40 mg/kg grubu beyin dokusundaki immunointensite düzeyi Travma grubuna oldukça benzerdi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20 μ m.



Resim 23: Travma + 80 mg/kg grubu TNF – α İmmunohistokimya. Travma + 80 g/kg grubunun beyin dokusunda inflamatuvar TNF- α immunodensitenin Travma ve Travma + 40 mg/kg gruplarından daha düşük yoğunlukta olduğu ve kontrol grubuna daha benzer bir immunointensite görüntüsü oluşturduğu tespit edildi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20 μ m.



Resim 24: Travma + 160 mg/kg grubu TNF – α İmmunohistokimya. Travma + 160 mg/kg grubunun inflamatuvar sitokin immunopozitiflik görüntüsü Kontrol grubuna oldukça benzer düzeydeydi. **Boyama:** TNF- α immunohistokimya. **Zıt boyama:** Hematoksilen. **Bar:** 20 μ m.

MDA(Malondialdehid) Analiz Sonuçları

Tablo 3: Grupların Doku MDA Düzeyleri

GRUPLAR	MDA (nmol/g protein)
Kontrol	8,62 ± 1,02 ^a
Travma	17,04 ± 1,04 ^c
Travma+40mg/kg(anetol)	16,94 ± 0,75 ^c
Travma+80mg/kg(anetol)	14,10 ± 1,60 ^{b,c}
Travma+160mg/kg(anetol)	11,20 ± 2,27 ^{a,b}

Gruplar arasındaki benzer üst simgelerin varlığı istatistiksel yönden benzerliği göstermektedir. Farklı üst simgeler istatistiksel yönden anlamlı farkı belirtmektedir. ^{a-}^bP<0.01, ^{a-c}P<0.01, ^{b-c}P<0.05. Yapılan MDA analiz sonuçlarında travma sonrası yükselen MDA düzeylerinin anetol dozu yükseldikçe dokuda anlamlı şekilde düştüğü gösterilmiştir.

5.TARTIŞMA

Travmatik beyin yaralanmaları ve bu yaralanma nedeniyle ortaya çıkan hasarlanmalar toplumun her yaştan kesimini ilgilendiren ve tüm dünyada sık görülen önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir(110). Dünyada her yıl travmatik beyin yaralanması yaklaşık olarak 50 milyonun üzerinde meydana gelmektedir (111). Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından yapılan çalışmalar ışığında travmalara bağlı tüm dünya genelinde 100 binde ortalama 83,7 olarak gösterilmekte iken ülkemizde bu oran 100 binde 120 civarında gösterilmektedir. Bu meydana gelen ölümlerin yaklaşık olarak %30'u kafa travmalarına ait olup yapılan son çalışmalarda bu oranın %50'lere çıktığı ortaya koyulmuştur(110). TBH'nın klinik özellikleri ve altında yatan kompleks patofizyoloji, özellikle klinik öncesi çalışmalarda, ayrıca faz I/II çalışmaların değerini daha da arttırmaktadır. Bu çalışmaların başarısı TBH'nın şiddetiyle bağlantılı olarak ümit verici terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açmıştır. Ancak şu durumda travmatik beyin yaralanmalarının tedavisine yönelik cerrahi müdahale dışında terapötik bir yöntem halen geliştirilememiştir(112). Bugüne kadar literatürde antioksidanların TBH'na karşı protektif gücünü araştıran çok sayıda makale bulunmaktadır. Yapılmış olan araştırmaların bir kısmında antioksidan terapilerin travmatik beyin hasarının neden olduğu merkezi sinir sistemi komplikasyonlarının hafifletici gücüne vurgu yapmış olmasına karşın, günümüzde TBH'nın tedavisini destekleyici rutin klinik bir uygulama bulunmamaktadır(113).

Anetol; anason yağında, yıldız anason yağında, rezene yağında yüksek miktarda bulunur. Uçucu yağların bitkilerde koruma ve iletişim gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Bitkiyi virüs, bakteri, mantar gibi ajanlardan korur. Otçul hayvanların bitkiyi yemesine engel olmakla birlikte bitkilerin üremelerine de katkı sağlamaktadır. Anason uçucu yağlarının sekretolitik, antispazmodik, sekretomotor ve antimikrobial özelliklerinden dolayı tıbbi olarak kullanımı mevcuttur. Geleneksel olarak anason mide rahatsızlıklarında, burun akıntısı, balgam sökücü, idrar sökücü ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır. Kadınlarda menstürel ağrıların tedavisinde, erkeklerde “erkek menapozu” semptomlarını tedavi etmek için kullanıldığı bilinmektedir. Diğer kullanım alanları olarak uykusuzluk, kabızlık, nöbet, nikotin bağımlılığı astım sayılabilmektedir. Anason sedef gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde direkt

olarak cilde uygulandığı da bilinmektedir. Anetol rezene(17) ve anason(18) gibi bitkilerde yüksek oranda bulunan bir uçucu yağ olup farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine yönelik bilimsel araştırma sonuçları bulunmaktadır. Yapılmış olan araştırmalarda Anetol'ün antioksidan, antikanserojenik , anti-inflamatuar ve antihipernositif etkisinin olması bu bitkisel yağın son dönemlerde araştırmalarda önemli bir yer edinmesini sağlamıştır(19).

Yürükler ve arkadaşları da travma sonrası melatonin tedavisinin nöroprotektif etkileri ve apoptotis üzerine olan etkilerini gözlemek amacıyla gerçekleştirmiştir. Yürükler ve arkadaşlarının ortaya çıkardığı bulgular ile bizim deneysel çalışmamız arasında sonuçları bakımından benzerlikler gösterdiğini söylemek mümkündür. Yaptıkları çalışmada kaspaz-3 ve kaspaz-9 immunoekspresyonunun melatonin tedavisi uygulanan hayvanlarda anlamlı derecede azaldığını göstermelerine karşın bizim yaptığımız çalışmada ise kaspaz-3 immunoekspresyonunun anetol tedavisi verilen hayvanlarda önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bizim araştırmamızda ek olarak pro-apoptotik Bax düzeyi de incelenmiştir. Özellikle travma grubunda kontrol grubuna kıyasla artış eğiliminde olan Bax immunoekspresyon düzeyindeki anlamlı artışın travmatik beyin hasarına karşı organın göstermiş olduğu refleks koruma mekanizmasında kaynaklandığını düşünmekteyiz. Buna ek olarak anetol tedavisi verilen gruplarla karşılaştırdığımızda ortaya çıkan Bax ekspresyon düzeyindeki ciddi anlamda azalma bu hipotezimizi desteklediği ve antioksidan potansiyeli bilinen anetolün travmatik beyin hasarına karşı organı koruyabileceğini desteklemektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda Marwa Matboli ve arkadaşları Anetol'ün güçlü antioksidan potansiyeline yönelik bulgular ile kalp iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu olabileceğine yönelik veriler sunmuştur(114). İskemi reperfüzyonuna maruz bırakılan hayvanlarda miyokardın incelenmesi, derin asidofilik sitoplazma ve koyu lekeli çekirdekler ile geniş ölçüde ayrılmış düzensiz kalp kası liflerini ortaya çıkardı. Miyokardiyum, interstisyumda çok sayıda lenfosit ile dilate, tıkanmış kan kılcal damarları ve mononükleer enflamatuar hücreler gösterdi. Anetol 200mg/kg ile tedavi edilen gruptaki sıçanlar, belirgin çizgileri ve interkalasyonlu diskleri olan merkezi oval veziküler çekirdekler içeren asidofilik kardiyak miyositleri gösterdi. Yine aynı çalışmada iskemiye maruz kalan hayvanların kardiyak TNF-alfa seviyesi önemli artış

göstermesine karşın 100mg/kg ve 200mg/kg doz verilen gruplarda TNF-alfa seviyesinin kardiyak içeriğini önemli ölçüde azalttığı tespit etmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da travma grubunda TNF-alfa seviyesinde ciddi bir artış meydana geldiği fakat özellikle 80mg/kg ve 160mg/kg dozunda anetol verilen gruplarda TNF-alfa seviyesinde önemli bir düşüş meydana geldiğini ortaya koyduk(114).

Başka bir çalışmada Caiyun Yu ve arkadaşları Anetol'un piliçlerde nekro-hemorajik enterit kaynaklı barsak bariyer işlev bozukluğunu ve barsak enflamasyonunu azalttığını tespit etmiştir(115). Yine bu çalışmada Nekro-hemorajik enterit oluşturulan grupta ileal Bax ve jejunal kaspaz-3'ün apoptotik indeksi ve mRNA ekspresyonlarını arttırırken jejunal Bcl-2'nin mRNA seviyelerini düşürdüğünü fakat 600mg/kg anetol uygulamasıyla bu etkilerin ortadan kaldırıldığını ortaya koydular. Bunun yanı sıra tedavi grupları arasında ileal apoptotik indeks, Bcl-2 ve kaspaz-3'ün mRNA seviyeleri ve jejunal Bax açısından anlamlı bir fark oluşmadığını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada nekro-hemorajik enterit oluşturulan grupta TNF-alfa ve IFN-gama'nın serum konsantrasyonlarının ölçüde arttığını özellikle 600 mg/kg anetol uygulamasının bu sitokinlerin üretimi önemli ölçüde azaldığını ortaya koydu. Ayrıca Nekro-hemorajik enterit oluşturulan anetol uygulama grubuna kıyasla ileal IL-4 ve jejunal IL-10'un daha düşük mRNA ifadeleri gösterdiğini ortaya koydular. Tüm bu bulgular ışığında 600 mg/kg anetol uygulaması, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini modüle ederek nekro-hemorajik enteriti tedavi edebileceğini öne sürmüşlerdir(115). Bizim yaptığımız çalışmada da travma grubuna kıyasla TNF-alfa, Bax ve kaspaz-3 miktarında önemli ölçüde azalma olduğu benzer şekilde ortaya koyulmuştur fakat bizim çalışmamızda mRNA ekspresyonları ve IFN-gama düzeyleri bakılmamıştır.

Bir başka çalışmada ise Sadık Moradi Vastegani ve arkadaşları Parkinson hastalığında anetolün rotenon kaynaklı motor olmayan bozukluklara ve oksidatif strese karşı nöroprotektif etkisinin olduğuna dair raporlar sunmuştur(116). Rotenon'un nöroinflamasyona neden olduğu hipokampal dejenerasyon ve hafızada belli bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir. Rotenon'a bağlı hasar oksidatif stres ve inflammatuar cevap sonrası oluşturduğu düşünüldüğünden antioksidan ve antiinflammatuar ajanların kullanımı öngörülmektedir. Parkinson hastalarında rotenon

kaynaklı MDA seviyelerinin arttığını ve hipokampal nöron kayıplarına neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmada yüksek doz anetol(250mg/kg) tedavisi sonrası bilişsel işlevleri iyileştirdiği ve hipokampal MDA seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak yüksek doz tedavisi sonrası hipokampal bölgede bulunan nöronların sağkalım sayılarını arttırdığı gözlemlendi. Bu bulgular eşliğinde anetolün rotenonun sebep olduğu motor olmayan hasarlara karşı hem nöroprotektif etkiye hem de antioksidan etkiye sahip olduğu gösterildi(116).

Anetolün etkilerini gösteren başka bir çalışmada ise Nancy S.Younis ve arkadaşları tarafından yapılan anetolün ön tedavi ile serebral iskemi/reperfüzyon düzenlediğine dair olan çalışmadır(117). Bu çalışmada orta serebral arter oklüzyonu öncesi 125mg/kg ve 250mg/kg dozlarda anetol verilmesi sonrası etkilerine bakılmıştır. Oklüzyon grubundaki sıçan korteksindeki ve hipokampal bölgedeki bazı nöronlar heterojen bir şekilde dağıldığını, hücre gövdesi büzülmüş ve aşırı derecede düzensiz olduğu, sitoplazma kırmızı lekeliydi, çekirdek piknotikti ve yapılarının belirsiz olduğu görüldü. Bununla birlikte, hipokampus, nörofaji ile piramidal hücrelerin belirgin nöronal dejenerasyonunu sundu.ancak işlem öncesi anetol tedavisi verilen gruplar, oklüzyon grubuna kıyasla sıçan korteksi ve hipokampus nöronlarının sayısında ve derecesinde belirgin gözle görülür bir azalma olduğunu ve buna ek olarak dejenerasyon, nekroz ve kayıpta belirgin bir düzelme olduğunu gösterdiler. Buna ek olarak oklüzyon grubunda MDA, SOD, katalaz içeriğinde önemli ölçüde artış meydana gelmişken işlem öncesi anetol verilen gruplarda MDA içeriğinin yanı sıra SOD ve katalaz miktarlarında da önemli ölçüde azalma meydana getirdi. Bakılan diğer parametrelerde oklüzyon grubunda inflamatuvar sitokinlerin(IL-1beta, IL-6 ve TNF-alfa) önemli ölçüde arttığı ve öncesinde anetol tedavisi verilen gruplarda bu inflamatuvar sitokinlerin artışlarının tersine döndüğü belirtilmiştir. Apoptotik belirteçlere gelince, oklüzyon uygulanan grupta Bax'ın gen ifadesindeki bir artışla bağlantılı olarak Bcl-2'nin gen ifadesinde bir azalma meydana gelmişken anetol uygulanan gruplarda bu değişiklikleri azalttığını ortaya koymuştur(117). Bizim çalışmamızda SOD ve katalaz düzeyleri bakılamamıştır fakat sitokin düzeyindeki azalma Bax düzeylerindeki azalmalar deneylerimizle uyumluluk göstermektedir.

Literatürde anetolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkisini araştıran hem deney hayvanı çalışması hem de klinik çalışmalar yönünden oldukça kısıtlıdır. Yaptığımız taramalarda anetolün özellikle nöroprotektif etkinliğini araştıran kısıtlı sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Bu nedenle yaptığımız çalışmanın önemi daha da artmakta ve daha detaylı yeni çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle yaptığımız bu deneysel çalışmada anetolün bu nöroprotektif özelliğine vurgu yapıp dikkatleri bu yöne çekmeye çalıştık çünkü anetolün antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı nöroprotektif etkilerinin güçlü olduğunu düşünüyor ve bu yönde daha fazla çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.



6.SONUÇ

Travmatik beyin hasarı (TBH), her yaşta görülebilen morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biri olması ve mevcut haliyle TBH'nın tedavisine yönelik cerrahi müdahale dışı terapötik bir yöntem geliştirilememiş olması preklinik çalışmaların önemini arttırmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada anetol travma sonrası uygulanmasında glial hücre miktarını arttırdığını bununla birlikte beyin dokusunun piramidal nöronlarında piramit üçgen görüntüsünün oldukça güçlü şekilde korunduğunu ve travmaya eşlik eden oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik indüksiyon gibi etmenlerden düşük düzeyde etkilendiğini ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak Bax immunopozitivitesinde anlamlı bir azalma, Caspase-3 immunointensitesinde anlamlı bir azalma ve TNF-alfa düzeylerinde ciddi düzeylerde azalmalar olduğunu tespit edilmiştir. Yapılan MDA analizlerinde travma sonrası artan MDA düzeylerinde özellikle yüksek doz anetol verilen gruplarda önemli düzeyde azalma sağlamıştır. Bu sonuçlar baz alındığında anetolün Ucuz bir bitkisel bileşen olması ve kolay elde edilebilirliği sayesinde TBH'da nöroprotektif olarak destek amacıyla kullanılabilecek bir ajan olduğunu düşünmekteyiz ancak travmanın şiddeti ve bireylerin travma şiddeti sonrası etkilenim durumlarının da bu oluşturulacak olası tedavi protokollerinde önemli bir rol oynayacağına inanmaktayız. Yaptığımız literatür taramalarında Anetol'ün TBH modeli oluşturulan hayvanlarda doz bağımlı koruyucu gücünün araştırılmasına yönelik halen bile herhangi bir çalışma bulunmamakta olup üzerinde çalışma yapılmasına ciddi şekilde ihtiyaç duyulmakta olduğunu düşünmekteyiz. Tüm bu sebepler göz önüne alındığında anetolün TBH'da nöroprotektif bir ajan olarak kullanılıp kullanılamayacağına yönelik çok daha detaylı ve yeni araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

- 1- Bruns, J.Jr., and Hauser, W. A. (2003). The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* 44, 2–10. doi: 10.1046/j.1528-1157.44.s10.3.x.
- 2- Dewan, M. C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R. E., Hung, Y. C., Punchak, M., et al. (2018). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 130, 1039–1408. doi: 10.3171/2017.10.JNS17352.
- 3- Maas, A. I. R., Menon, D. K., Adelson, P. D., Andelic, N., Bell, M. J., Belli, A., et al. (2017). Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 16, 987–1048. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30371-X
- 4- Zaloshnja, E., Miller, T., Langlois, J. A., and Selassie, A. W. (2008). Prevalence of long-term disability from traumatic brain injury in the civilian population of the United States, 2005. *J. Head Trauma Rehabil.* 23, 394–400. doi: 10.1097/01.htr.0000341435.52004.ac
- 5- Bazarian, J. J., Cernak, I., Noble-Haeusslein, L., Potolicchio, S., and Temkin, N. (2009). Long-term neurologic outcomes after traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 24, 439–451. doi: 10.1097/htr.0b013e3181c15600
- 6- LEE, A. Y. W., & Ng, S. Y. (2019). Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 528.
- 7- Xiong, Y., Peterson, P. L., & Lee, C. P. (1999). Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 16(11), 1067-1082.
- 8- Pearn, M. L., Niesman, I. R., Egawa, J., Sawada, A., Almenar-Queralt, A., Shah, S. B., ... & Head, B. P. (2017). Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. *Cellular and molecular neurobiology*, 37(4), 571-585.
- 9- Lenzlinger, P. M., Morganti-Kossmann, M. C., Laurer, H. L., & McIntosh, T. K. (2001). The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Molecular neurobiology*, 24(1), 169-181.
- 10- O'Connell, K. M., & Littleton-Kearney, M. T. (2013). The role of free radicals in traumatic brain injury. *Biological research for nursing*, 15(3), 253-263.
- 11- Skandsen, T., Kvistad, K. A., Solheim, O., Strand, I. H., Folvik, M., and Vik, A. (2010). Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *J. Neurosurg.* 113, 556–563. doi: 10.3171/2009.9.JNS09626.
- 12- Lotocki, G., de Rivero Vaccari, J. P., Perez, E. R., Sanchez-Molano, J., Furones-Alonso, O., Bramlett, H. M., et al. (2009). Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *J. Neurotrauma* 26, 1123–1134. doi: 10.1089/neu.2008.0802

- 13- Morganti-Kossmann, M. C., Rancan, M., Stahel, P. F., and Kossmann, T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Cur. Opin. Crit. Care* 8, 101–105. doi: 10.1097/00075198-200204000-00002
- 14- Clark, R. S., Kochanek, P. M., Chen, M., Watkins, S. C., Marion, D. W., Chen, J., et al. (1999). Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J.* 13, 813–821. doi: 10.1096/fasebj.13.8.813
- 15- Zhang, X., Graham, S. H., Kochanek, P. M., Marion, D. W., Nathaniel, P. D., Watkins, S. C., et al. (2003). Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB J.* 17, 1367–1369. doi: 10.1096/fj.021067fje
- 16- Hall, E. D., Vaishnav, R. A., & Mustafa, A. G. (2010). Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 51-61.
- 17- KAN, Y. Farklı Koşullarda Yetiştirilen Rezene Meyvelerinin Uçucu Yağ Bileşenleri: Composition of Essential Oil Of Fennel Fruits Cultivated at Different Conditions. *J. Fac. Pharm, Ankara* 35 (2) 95 - 101 , 2006.
- 18- Haşimi, N., Tolan, V., KIZIL, S., & KILINÇ, E. (2014). Anason (*Pimpinella anisum* L.) ve kimyon (*Cuminum cyminum*) tohumlarının uçucu yağ içeriği, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Journal of Agricultural Sciences*, 20(1), 19-26.
- 19- Ritter, A. M. V., Ames, F. Q., Otani, F., de Oliveira, R. M. W., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. A. (2014). Effects of anethole in nociception experimental models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- 20- Matboli, M., Hasanin, A. H., Hamady, S., Khairy, E., Mohamed, R. H., Aboul-Ela, Y. M., ... & Agwa, S. H. (2022). Anti-inflammatory effect of trans-anethol in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113070.
- 21- Soares, P. M. G., Lima, R. F., de Freitas Pires, A., Souza, E. P., Assreuy, A. M. S., & Criddle, D. N. (2007). Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. *Life sciences*, 81(13), 1085-1093.
- 22- Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16(9), 7672-7690.
- 23- Ergünger F. Kafa travmalarında patofizyoloji. In: Kofralı E, Zileli M, Ziyal İ, Ünlü A (eds). *Temel Nöroşirurji*. 1. cilt. Ankara: Buluş Tasarım ve Matbaacılık Hizmetleri, 2010;553-580.
- 24- Gökalp Z. Nöroşirurji ders kitabı, mars matbaası, Ankara, 1998
- 25- Paşaoğlu A. Erişkinde Kafa travmaları, Temel nöroşirurji kitabı(2005)

- 26- Jennett B. Historical perspective on head injury. In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT. Eds,1996
- 27- Jennet B. Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage A practical scale. Lancet 1:480-484,1975
- 28- Feigin VL, Theadom A, Barker-Collo S, Starkey NJ, McPherson K, Kahan M, et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. Lancet Neurol. 2013;12(1):53-64. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70262-4.
- 29- Akkose S, Armağan E, Bulut M, Tokyay R: Trauma care system in Turkey and the approach to patients suffering head trauma. Ulus Travma Derg 8:1-2, 2002
- 30- A, Sabanci PA, Cansever T, Hepgul KT, Imer M, Dolaş I, Taviloğlu K: Epidemiological study in head injury patients. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 15:159–163,2009
- 31- Jee JH, Kelly DF, Oertel M, McArthur DL, Gleen TC Carbon dioxide reactivity,pressure autoregulation and metabolic suppression reactivity after head injury: a transcranial doppler study,2001
- 32- Kraus JF, McArthur DL, Silverman TA, Jayarama M. Epidemiology of brain injury. Narayan RK(eds)neurotravma McGraw Hill Company, New York 1996:22-24
- 33- Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet. 1974; 2:81-84.
- 34- Reilly PL. Brain injury: the pathophysiology of the first hours.398-403,2001
- 35- Ergünör MF, Kafa travmalarında patofizyoloji, Temel Nöroşiruji, Türk Nöroşiruji Derneği Yayınları,Ankara 27:298-305,2005
- 36- Ergünör MF, Kafa travmalarında patofizyoloji, Temel Nöroşiruji, Türk Nöroşiruji Derneği Yayınları,Ankara 27:298-305,2005
- 37- Graham DI, Neuropathology of the head injury, In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT. Ed. Neurotravma. Mc Graww Hill: New York: p43-58,1996
- 38- Ergünör MF, Kafa travmalarında patofizyoloji, Temel Nöroşiruji, Türk Nöroşiruji Derneği Yayınları,Ankara 27:298-305,2005
- 39- <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/diffuse-axonal-injury>
- 40- Graham DI, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, McLellan DR, Ischemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. J Neurol Neurosurg Psychiatry 52:346-350, 1989
- 41- Geddes JF. Primary traumatic brain injury. In:Whitwell H.L (ed). Forensic Neuropathology, Oxford University Press, New York,94-107,2005
- 42- Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Diffuz axonal injury and traumatic coma in the primate. Ann Neurol 12(6): 564-574, 1982
- 43- Ergünör MF, Kafa travmalarında patofizyoloji, Temel Nöroşiruji, Türk Nöroşiruji Derneği Yayınları,Ankara 27:298-305,2005
- 44- Kempinski O. Cerebral edema. Semin Nephrol 21(3): 303-307, 2001

- 45- Mokri B: The Monro-Kellie Hypothesis: Applications in CSF volume depletion. *Neurology* 56(12):1746-1748, 2015
- 46- Marmarou A. A. Review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. *Neurosurg Focus* 22(5); E1. 2007
- 47- Harauz G, Ishiyama N, Hill CM, Bates IR, Libich DS, Fares C. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron* 2004;35(7):503-42
- 48- Perumal J, Filippi M, Ford C, Johnson K, Lisak R, Khan O. Glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006; 2(6): 1019-29.
- 49- Rolf N, Boehm H, Kaindl AM, Lauterbach I, Suttrop M. Acute ascending motoric paraplegia following intrathecal chemotherapy for treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: case reports and review of the literature. *Klin Padiatr* 2006; 218(6): 350-4.
- 50- Zemlan FP, Rosenberg WS, Luebke PA, Campbell TA, Dean GE, Weiner NE, Cohen JA, Rudick RA, Woo D. Quantification of axonal damage in traumatic brain injury: affinity purification and characterization of cerebrospinal fluid tau proteins. *J Neurochem* 1999; 72: 741-50
- 51- Shaw GJ, Jauch EC, Zemlan FP. Serum cleaved tau protein levels and clinical outcome in adult patients with closed head injury. *Ann Emerg Med* 2002; 39(3): 254-7.
- 52- Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 1994; 4(3): 229-37
- 53- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003; 60(6): 614-32.
- 54- Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Gonçalves CA, et al. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 2006; 37 (5): 683-6.
- 55- Raabe A, Grolms C, Seifert V. Serum markers of brain damage and outcome prediction in patients after severe head injury. *Br J Neurosurg* 1999; 13(1): 56-9.
- 56- Salehi A, Zhang JH, Obenaus A. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(7):2320-2339. doi: 10.1177/0271678X17701460.
- 57- Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, et al. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:97-106. doi: 10.2147/NDT.S65815.
- 58- Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(5):593-606.

- 59- Agha A, Thompson CJ. Anterior pituitary dysfunction following traumatic brain injury (TBI). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(5):481-8.
- 60- Manwaring JD, Csallany AS. Malondialdehyde-containing proteins and their relationship to vitamin E. *Lipids*. 1988;23(7):651-5.
- 61- Koura SS, Doppenberg EM, Marmarou A, Choi S, Young HF, Bullock R. Relationship between excitatory amino acid release and outcome after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl*. 1998;71:244-6.
- 62- Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, ve ark. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg*. 1998; 89: 507–518.
- 63- DeWitt DS, Prough D. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma*. 2003; 20: 795 – 825.
- 64- Obrenovitch TP, Urenjak J. Is high extraselluer glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? *J Neurotrauma* 14: 677-698, 1997
- 65- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*. 2006; 147: S232 – 240.
- 66- Fabricius M, Fuhr S, Bahtia R, ve ark. Cortical spreading depression and periinfarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*. 2006; 129: 778 – 790.
- 67- Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004;4(1):65-84
- 68- Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma*. 1994 Oct;11(5):499-506.
- 69- Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulations in traumatic brain injury. *Drug discov Today* 2008; 13(23-24): 1082-1089
- 70- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international* 2019;43:582-92
- 71- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516
- 72- Adamkov M. Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic apoptosis. *Srp Arh Celok Lek* 2019;147:98-104
- 73- Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances* 2019;37:459-75.
- 74- Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:175-93.
- 75- Du Toit A. Cell death: Balance through a bivalent regulator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:546.

- 76- Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13944-9.
- 77- Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* 2018;285:416-31
- 78- Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ* 2018;25:46-55.
- 79- Choo Z, Loh AHP, Chen ZX. Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers. *Cancers (Basel)* 2019;11:1623.
- 80- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
- 81- http://norosirurji.dergisi.org/pdf/pdf_TND_1584.pdf
- 82- Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;80(2):291-300.
- 83- http://norosirurji.dergisi.org/pdf/pdf_TND_1584.pdf
- 84- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M: Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci* 14:128-142,2013
- 85- Weber JT. Experimental models of repetitive brain injuries. *Prog Brain Res.* 2007;161:253- 61.
- 86- http://norosirurji.dergisi.org/pdf/pdf_TND_1584.pdf
- 87- McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989;28(1):233-44.
- 88- Kabadi SV, Hilton GD, Stoica BA, Zapple DN, Faden AI. Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. *Nat Protoc* 2010;5(9):1552–1563.
- 89- Ma X, Aravind A, Pfister BJ, Chandra N, Haorah J. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol.* 2019;56(8):5332-5345.
- 90- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 1991;39(3):253-62.
- 91- Williams AJ, Hartings JA, Lu XC, Rolli ML, Dave JR, Tortella FC. Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005;22(2):313-31.
- 92- Oktay M, Gülcin I, Küfrevioglu O. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm Wiss Technol.* 2003;36:263-271.
- 93- Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;253643:1-8.
- 94- Maruzzella J, Freundlich M. Antimicrobial substances from seeds. *J Am Pharm Assoc.* 1959;48:356-358.

- 95- Hammer K, Carson C, Riley T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol.* 1999;86:985-990.
- 96- Padilha de Paula J, Gomes-Carneiro M, Paumgartten F. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *J Ethnopharmacol.* 2003;88(2-3):253-260.
- 97- Cambar PJ, Aviado DM. Bronchopulmonary effects of paraquat and expectorants. *Arch Env Health.* 1970;20:488-494.
- 98- Massimiliano T, Vigilio B, Simona B, Renato B, Mariannina I, Elisabetta B. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol Res.* 2007;56(3):254-260.
- 99- Coelho-de-Souza AN, Lahlou S, Barreto JEF, Yum MEM, Oliveira AC, Oliveira HD, Celedônio NR, Feitosa RGF, Duarte GP, Santos CF, de Albuquerque AAC, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27:288-298.
- 100- Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gülçin İ, Büyükokuroğlu ME. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2007;13(4):607-611.
- 101- Boyd EM, Sheppard EP. The effect of steam inhalation of volatile oils on the output and composition of respiratory tract fluid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968;163:250-256.
- 102- Müller-Limmroth W, Fröhlich H. Wirkungsnachweis einiger phytotherapeutischer Expektorantien auf den mukoziliaren transport. *Fortschr Med.* 1980;98:95-101.
- 103- Alessandra M, Fernando O, Franciele Q, Rubia M. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;345829, 7 pages.
- 104- Chainy GBN, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-KB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene.* 2000;19:2943-2950.
- 105- Janet M, Fatemeh A, Jalal Z. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF-a and IL-1 β in a Rat Model of LPS-induced periodontitis. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(4):1319-1325.
- 106- Ponte EL, Sousa PL, Rocha MVAP, Soares PMG, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH, Assreuy AMS. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacol. Rep.* 2012;64:984-990.
- 107- Talita P, Márcia M, Expedito L. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2013;386(4):331-338.
- 108- Minnema DJ. 90-Day subchronic dietary toxicity study of trans-anethole in mice. 1997, CHV2595- 103. Corning Hazleton Inc. Vienna, VA.

- 109- Zhang, X. S., Lu, Y., Li, W., Tao, T., Peng, L., Wang, W. H., ... & Li, W. (2021). Astaxanthin ameliorates oxidative stress and neuronal apoptosis via SIRT1/NRF2/Prx2/ASK1/p38 after traumatic brain injury in mice. *British journal of pharmacology*, 178(5), 1114-1132.
- 110- Jennet B. Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage A practical scale. *Lancet* 1:480-484,1975
- 111- Feigin VL, Theadom A, Barker-Collo S, Starkey NJ, McPherson K, Kahan M, et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. *Lancet Neurol.* 2013;12(1):53-64. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70262-4.
- 112- LEE, A. Y. W., & Ng, S. Y. (2019). Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 528.
- 113- Hall, E. D., Vaishnav, R. A., & Mustafa, A. G. (2010). Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 51-61.
- 114- Matboli, M., Hasanin, A. H., Hamady, S., Khairy, E., Mohamed, R. H., Aboul-Ela, Y. M., ... & Agwa, S. H. (2022). Anti-inflammatory effect of trans-anethol in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113070.
- 115- Yu, C., Wang, D., Tong, Y., Li, Q., Yang, W., Wang, T. and Yang, Z. (2022). Trans-Anethole Alleviates Intestinal Barrier Dysfunction and Intestinal Inflammation Induced by Subclinical Necro-Hemorrhagic Enteritis in Broilers. *Frontiers in Microbiology* , 13 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831882>
- 116- Vastegani SM, Khoshnam SE, Mansouri E, Hajipour S, Ghafouri S, Bakhtiari N, Sarkaki A, Farbood Y. Neuroprotective effect of anethole against rotenone induced non-motor deficits and oxidative stress in rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2023 Feb 2;437:114100. doi: 10.1016/j.bbr.2022.114100. Epub 2022 Sep 6. PMID: 36075399.Feb 2;437:114100. doi: 10.1016/j.bbr.2022.114100. Epub 2022 Sep 6. PMID: 36075399.
- 117- Younis NS, Mohamed ME. Anethole Pretreatment Modulates Cerebral Ischemia/Reperfusion: The Role of JNK, p38, MMP-2 and MMP-9 Pathways. *Pharmaceutics (Basel).* 2023 Mar 15;16(3):442. doi: 10.3390/ph16030442. PMID: 36986541; PMCID: PMC10057436.